

論文目録

報 告 番 号	乙 薬 第 号	氏 名	佐 野 友 春
学位論文題目	糸状藍藻 <i>Oscillatoria agardhii</i> の生理活性ペプチドに関する研究		
公刊論文			
(1) "Oscillamide Y, A Chymotrypsin Inhibitor from Toxic <i>Oscillatoria agardhii</i> ", <u>Sano, T.</u> and Kaya, K. <i>Tetrahedron Lett.</i> , (1995) <b>36</b> , 5933-5936.			
(2) "A 2-Amino-2-Butenoic Acid (Dhb)-Containing Microcystin Isolated from <i>Oscillatoria agardhii</i> ", <u>Sano, T.</u> and Kaya, K. <i>Tetrahedron Lett.</i> , (1995) <b>36</b> , 8603-8606.			
(3) "Oscillapeptin G, a Tyrosinase Inhibitor from Toxic <i>Oscillaotoria agardhii</i> ", <u>Sano, T.</u> and Kaya, K. <i>J. Nat. Prod.</i> , (1996) <b>59</b> , 90-92.			
(4) "Oscillatorin, A Chymotrypsin Inhibitor from Toxic <i>Oscillatoria Agardhii</i> ", <u>Sano, T.</u> and Kaya, K. <i>Tetrahedron Lett.</i> , (1996) <b>37</b> , 6873-6876.			
(5) "A 3-amino-10-chloro-2-hydroxydecanoic acid-containing tetrapeptide from <i>Oscillatoria agardhii</i> ", <u>Sano, T.</u> and Kaya, K. <i>Phytochem.</i> , accepted			
公刊参考論文			
(1) "Synthesis of carbon-bridged pyrimidine cyclonucleosides", Ueda, T.; Shuto, S.; <u>Sano, T.</u> ; Usui, H. and Inoue, H. <i>Nucleic Acid Res. Symposium Series</i> , (1982) <b>11</b> , 5-9.			
(2) "Structure of 2',3'- <i>O</i> -isopropylidene-6-cyanouridine", Yamagata, Y.; Kobayashi, Y.; Okaba, N.; Tomita, K.; <u>Sano, T.</u> ; Inoue, H. and Ueda, T. <i>Nucleosides &amp; Nucleotides</i> , (1983) <b>2</b> , 335-343.			
(3) "Nucleosides and Nucleotides. LIV. Synthesis of 6,6'-cyclo-5',6'-dideoxyhexofuranosyl-uracils <i>via</i> radical cyclization of a 6-cyanouridine", <u>Sano, T.</u> ; Inoue, H. and Ueda, T. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> , (1985) <b>33</b> , 1856-1860.			
(4) "Synthesis of 2'-deoxy-6,2'-methano-cyclouridine ( Nucleosides and Nucleotides LIX )", <u>Sano, T.</u> ; Inoue, H. and Ueda, T. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> , (1985) <b>33</b> , 3595-3598.			
(5) "Synthesis of 6,2'-methano-cyclouridine, a uridine fixed in high-anti conformation ( Nucleosides and Nucleotides LX )", <u>Sano, T.</u> ; Shuto, S.; Inoue, H. and Ueda, T. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> , (1985) <b>33</b> , 3617-3622.			



- (6) "Synthesis of 2'-deoxy-6,3'-methano-cyclo-pyrimidine nucleosides", Yoshimura, Y.; Sano, T.; Matsuda, A. and Ueda, T. *Nucleic Acid Res. Sympo. Series*, (1986) **17**, 53-55.
- (7) "Synthesis of 6,3'-methanocytidine, 6,3'-methanouridine, and their 2'-deoxyribonucleosides (Nucleosides and Nucleotides LXXVII)", Yoshimura, Y.; Sano, T.; Matsuda, A. and Ueda, T. *Chem. Pharm. Bull.*, (1988) **36**, 162-167.
- (8) 「二酸化窒素の肺腫瘍発生促進作用に関する実験的研究」嵯峨井 勝、市瀬 孝道、佐野 友春、村上 正孝、藤井 敬二、大気汚染学会誌 (1990) **25**, 324-333.
- (9) "Definition of total biosynthesis pathway of taurolipids in *Tetrahymena* cells", Kaya, K. and Sano, T. *Biochim. Biophys. Acta*, (1991) **1084**, 101-104.
- (10) "Tetrahydropyran ring-containing fatty acid-combined taurine (tetrathermoyltaurine) in the taurolipid fraction of *Tetrahymena thermophila* ", Kaya, K.; Sano, T. and Shiraishi, F. *Biochim. Biophys. Acta*, (1992) **1127**, 22-27.
- (11) "A Method for Micro-Determination of Total Microcystin Content in Waterblooms of Cyanobacteria (Blue-Green Algae)", Sano, T.; Nohara, K.; Shiraishi, F. and Kaya, K. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, (1992) **49**, 163-170.
- (12) "A Novel Disialoganglioside in Rat Spleen Lymphocytes", Nohara, K.; Suzuki, M.; Inagaki, F.; Sano, T. and Kaya, K. *J. Biol. Chem.*, (1992) **267**, 14982-14986.
- (13) "Thioic O-acid ester in sulfolipid isolated from freshwater picoplankton cyanobacterium, *Synechococcus* sp.", Kaya, K.; Sano, T.; Watanabe, M. M.; Shiraishi, F. and Ito, H. *Biochim. Biophys. Acta*, (1993) **1169**, 39-45.
- (14) "An Activation-associated Ganglioside in Rat Thymocytes", Nohara, K.; Sano, T. and Shiraishi, F. *J. Biol. Chem.*, (1993) **268**, 24997-25000.
- (15) "Astasin, a novel cytotoxic carbohydrate-conjugated ergosterol from the colorless euglenoid, *Astasia longa* ", Kaya, K.; Sano, T. and Shiraishi, F. *Biochim. Biophys. Acta*, (1995) **1255**, 201-204.
- (16) "Synthesis of N-(1-Nitropyren-6-yl and 8-yl)-2'-deoxyribonucleosides", Sano, T. and Kaya, K. *Chem. Res. Toxicol.*, (1995) **8**, 699-702.
- (17) "Nostocyclin, A Novel 3-Amino-6-hydroxy-2-piperidone-containing Cyclic Depsipeptide from the Cyanobacterium *Nostoc* sp.", Kaya, K.; Sano, T.; Beattie, K. A. and Codd, G. A. *Tetrahedron Lett.*, (1996) **37**, 6725-6728.
- (18) 「エレクトロポレーションによる新しい細胞毒性スクリーニング法の開発 ―培養株ヒト白血病細胞HL60への適用―」, 白石不二雄、佐野友春、彼谷邦光, 環境化学, (1996) **6**, 551-557.

その他 (総説・単行本等)

- (1) 「環境変異源物質 1-ニトロピレンおよびその代謝物とDNAとの付加物の構造」、佐野 友春, 化学と工業, (1991), **44**, 2152-2153.

論文内容要旨

報告番号	乙 薬 第	号	氏 名	佐 野 友 春
学位論文題目	糸状藍藻 <i>Oscillatoria agardhii</i> の生理活性ペプチドに関する研究			
<p>藍藻類は光合成を行う原核生物で、淡水湖沼、汽水域、海洋、土壌など様々な環境下で生育しており、生育環境によってユニークな化学構造や生理活性を示す物質を生産することが知られている。特に、海洋生物に共生する藍藻から有用な化合物が単離されている。藍藻は培養も比較的容易なため、医薬品リード化合物の新たな天然物資源として注目されている。</p> <p>淡水産藍藻の有毒物質については精力的な研究が行われ、肝臓毒や神経毒が構造決定されている。しかし、淡水産藍藻の毒物以外の生理活性物質についてはあまり研究が行われておらず、特に、有毒種が多い糸状藍藻 <i>Oscillatoria</i> 属についてはほとんど化学成分研究が行われていない。</p> <p>そこで、本研究では、<i>Oscillatoria</i> 属の中でも自然界で優占種となることが多い <i>Oscillatoria agardhii</i> に注目し、その生理活性物質の検索を行うことを計画した。その結果、糸状藍藻 <i>Oscillatoria agardhii</i> は化学構造的に非常に興味深い生理活性ペプチドを生産していることを見出した。これらの生理活性ペプチドについて詳細に研究を行い、以下のような知見を得た。</p> <p>1) <i>O. agardhii</i> が生産する肝臓毒 microcystin を単離し、その構造を解析した結果、MS とアミノ酸分析では既存の 3-desmethylnicrocystin と区別がつかない Dhb-microcystin-RR, HtyR,および LR の構造を NMR を用いて明らかにした。この Dhb-microcystin の構造を決定する際に、HMBC 法よりも微弱な結合を測定可能な decoupled-HMBC 法が有効であった。Dhb-microcystin の細胞毒性は microcystin-LR よりやや強い値を示した。</p> <p>2) トリプトファンの分子内環化反応とイソプレニユニットの付加反応によって生合成されたと考えられる新規異常アミノ酸 (3a-cis)-1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-3a-(3-methyl-2-butenyl)-pyrrolo[2,3-b]indol-2-carboxylic acid (oscillatoric acid) ユニットを含む環状ペプチド Oscillatorin を単離し、その構造を決定した。Oscillatorin はキモトリプシンを強力に阻害し、その IC<sub>50</sub> は 8 x 10<sup>-7</sup> M であった。</p> <p>3) 3-Amino-6-hydroxy-2-piperidone (Ahp) 残基を含む新規環状ペプチド Oscillapeptin A～C、</p>				



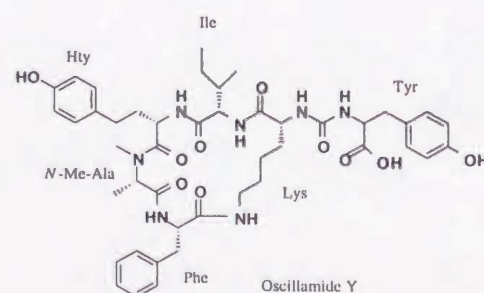
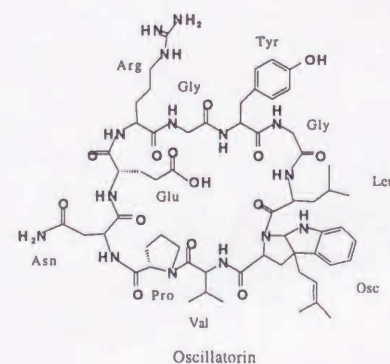
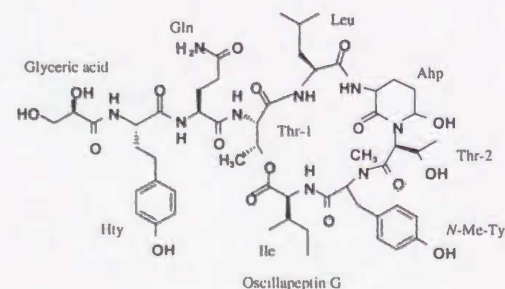
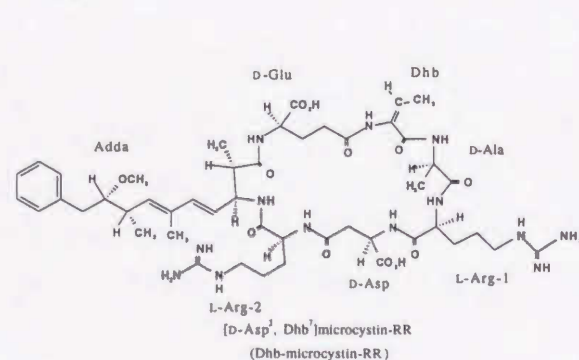
および G の構造を決定した。Oscillapeptin B はトリプシンの活性を強力に阻害し、その IC<sub>50</sub> は  $7 \times 10^{-9} M$  であった。Oscillapeptin A、C、および G はキモトリプシンを強力に阻害し、その IC<sub>50</sub> はそれぞれ  $3 \times 10^{-9} M$ ,  $7 \times 10^{-8} M$ ,  $4 \times 10^{-9} M$  であった。また、その構造と阻害酵素特異性に関して新たな知見を得た。

4) ウレイド結合を有し、homotyrosine および *N*-Me アミノ酸を含む環状ペプチド Oscillamide A~C, H, および Y を単離した。Oscillamide B および Y はキモトリプシンを阻害した。

5) 淡水産の藍藻から塩素で置換された 3-amino-10-chloro-2-hydroxydecanoic acid (ClAhda) を含む新規鎖状ペプチド Oscillagin A およびその脱塩素体 Oscillagin B を単離し、その構造を決定した。Oscillagin A および B はキモトリプシンを阻害した。

本研究で *Oscillatoria agardhii* から得られたペプチドは、環状となったものが多く、さらに、Ahp や oscillatoric acid などの環状アミノ酸や  $\beta$ -アミノ酸などの異常アミノ酸を多く含んでいた。これら環状ペプチドは、デプシペプチドとなったものやウレイド結合を含むものもあり、構造的に興味深い。さらに、これら環状ペプチドはアミノ酸組成も多様性に富み、医薬品のリード化合物となることが期待される。

本研究で用いた *Oscillatoria agardhii* は環状ペプチドの宝庫ともいえるもので、Dhb-microcystin 以外は同じ構造の化合物が見つからないほど、株によって生産しているペプチドの構造がそれぞれ異なり、医薬品リード化合物の資源としても有用であることが確認された。



## 様式9

### 論文審査の結果の要旨

報告番号	乙 葉 第 24 号	氏 名	佐 野 友 春
	主 査	楠 見 武 雄 (補)	
審査委員	副 査	高 石 喜 久 (亮)	
	副 査	空 戸 宏 造 (清)	

### 学位論文題目

糸状藍藻 *Oscillatoria agardhii* の生理活性ペプチドに関する研究

### 審査結果の要旨

佐野友春氏による「糸状藍藻 *Oscillatoria agardhii* の生理活性ペプチドに関する研究」と題する本論文の内容は、飲料水として使われている湖沼に繁茂する藍藻（通称アオコ）が生産する強力な肝臓毒及び各種の酵素阻害活性を有する新規な環状ペプチドの構造及びそれらの生理活性に関するものである。今回単離された環状ペプチドには、自然界でこれまで発見されたことのない新しいアミノ酸が構成員として組み込まれており、化学構造を決定する際に困難をもたらしているが、佐野氏は最も新しいNMRスペクトル技法を応用することによりこの困難を克服している。また、アオコがこれまでほとんど注目されなかったことがない各種の酵素阻害活性を有することを明らかにしており、学問的に大きな価値が認められた。

論文は化学、生物学、生化学的内容に富んでいるだけでなく、自然環境の破壊の結果としての生物的湖沼汚染について社会的な警鐘を与える内容も含んでおり、環境薬学的、社会薬学的にも注目すべき高いレベルを有している。

本論文は構成、論理性、および科学的信頼性において優れており、主査及び副査の全員が、本論文を博士論文としてふさわしい内容であると判断するに至った。





糸状藍藻 *Oscillatoria agardhii* の  
生理活性ペプチドに関する研究

1996

佐 野 友 春

糸状藍藻 *Oscillatoria agardhii* の  
生理活性ペプチドに関する研究

1996

佐 野 友 春



## 目次

第1章 序論	1
第2章 2-Amino-2-butenic acid (Dhb) を含む新規 microcystin 類 Dhb-microcystin-RR, HtyR, および LR	
第1節 Dhb-microcystin 類の単離	5
第2節 Dhb-microcystin-RR の構造解析	6
第3節 Dhb-microcystin-HtyR および LR の構造解析	17
第4節 Dhb-microcystin 類の生理活性	22
第5節 考察	23
第3章 異常アミノ酸 (3a-cis)-1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-3a-(3-methyl-2-butenyl)-pyrrolo-[2,3-b]indol-2-carboxylic acid ユニットを含む新規環状ペプチド Oscillatorin	
第1節 Oscillatorin の単離	24
第2節 Oscillatorin の構造解析	25
第3節 Oscillatorin の生理活性	35
第4節 考察	36
第4章 3-Amino-6-hydroxy-2-piperidone (Ahp) を含む新規環状ペプチド Oscillapeptin A~C, および G	
第1節 Oscillapeptin 類の単離	37
第2節 Oscillapeptin G の構造解析	38
第3節 Oscillapeptin A~C の構造解析	47
第4節 Oscillapeptin 類の生理活性	57
第5節 考察	58
第5章 分子内ウレイド結合を含む新規環状ペプチド Oscillamide A~C, H, および Y	
第1節 Oscillamide 類の単離	59
第2節 Oscillamide Y の構造解析	61
第3節 Oscillamide A~C, および H の構造解析	70
第4節 Oscillamide 類の生理活性	82
第5節 考察	83
第6章 3-Amino-2-hydroxydecanoic acid を含む新規鎖状ペプチド Oscillagin A および B	

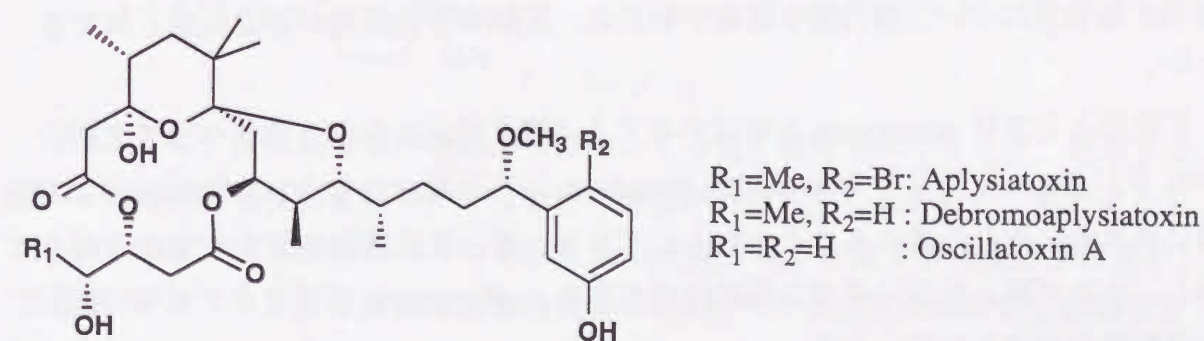
第1節	Oscillaginin A および B の単離	84
第2節	Oscillaginin A の構造解析	85
第3節	Oscillaginin B の構造解析	94
第4節	Oscillaginin 類の生理活性	96
第5節	考察	97
第7章 結語		98
実験の部		
一般的方法		100
第2章の実験の部		101
第3章の実験の部		103
第4章の実験の部		104
第5章の実験の部		107
第6章の実験の部		110
参考文献		113
謝 辞		116

## 第1章 序論

藍藻は細菌と同様、原核生物でありながら、植物と同じように水を分解して電子を得て CO<sub>2</sub> を還元し、酸素を放出する光合成生物である。藍藻は、淡水湖沼、汽水域、海洋あるいは土壌などあらゆるところで生育している。大部分の藍藻は水中で浮遊あるいは付着して生育しており、生活環境が陸上とはかなり異なっているため、多種多様な二次代謝産物を生産することが予想される。また、藍藻は海綿、ホヤ、ヒラムシなどの水中生物に共生していることが知られており、これらの生物から単離構造決定された生理活性物質の中には、共生藍藻によって生産されていると考えられている化合物がある。藍藻は渦鞭毛藻などと比較すると培養がしやすいこともあり、医薬品リード化合物の新たな資源として注目されている<sup>1),2)</sup>。

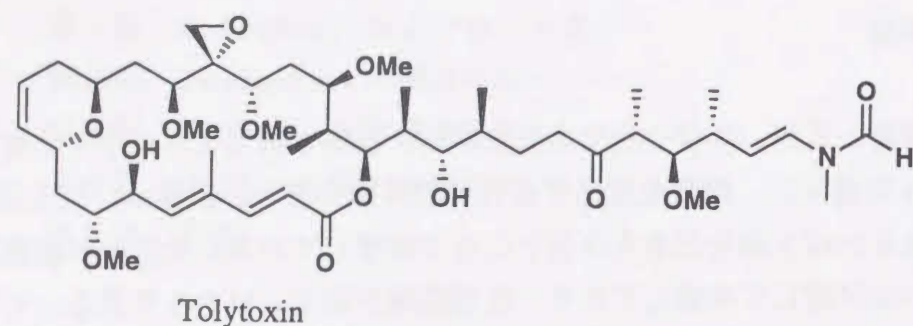
藍藻の生理活性物質については、海水浴中の皮膚傷害や食中毒の原因物質究明のために行われた海産藍藻について多くの報告があり、現在までに、細胞毒性、抗カビ、酵素阻害、発ガンプロモーションなどの作用を示す化合物が単離構造決定されている。

*Lyngbya* 属や *Oscillatoria* 属から単離されたマクロライド debromoaplysiatoxin<sup>3)</sup> や oscillatoxin A<sup>4)</sup> は細胞毒性を示す化合物である。これらは1974年にハワイ産のアメフラシの中腸腺から単離された aplysiatoxin と類似の構造をしており<sup>5)</sup>、プロテインキナーゼCの活性化と発ガン促進をする。

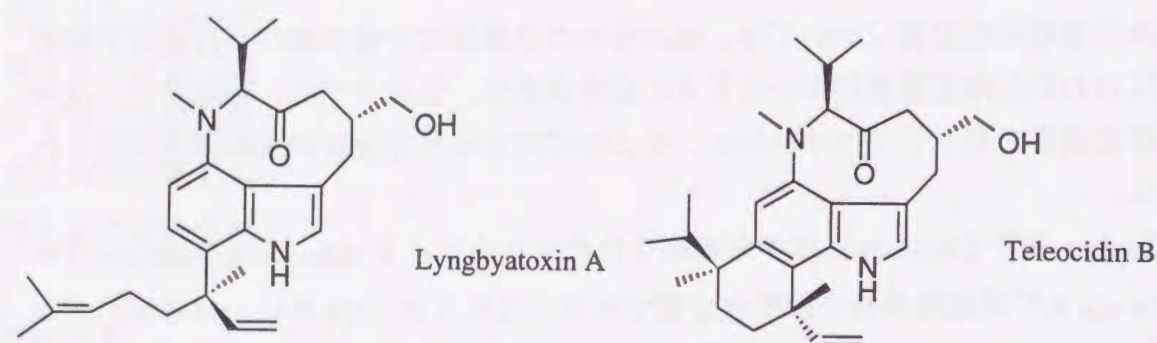


また、*Tolypotrix conglutinata* から1977年に単離されたマクロライド tolytoxin は強い細胞毒性と抗カビ活性を示す<sup>6)</sup>。類似のマクロライド scytophycins が *Scytonema* 属からも得られている<sup>7)</sup>。Tolytoxin とほぼ同じ側鎖を有するマクロライド kabiramides がミカドウミウシから単離されており<sup>8)</sup>、kabiramides は藍藻由来である可能性が指摘されている。



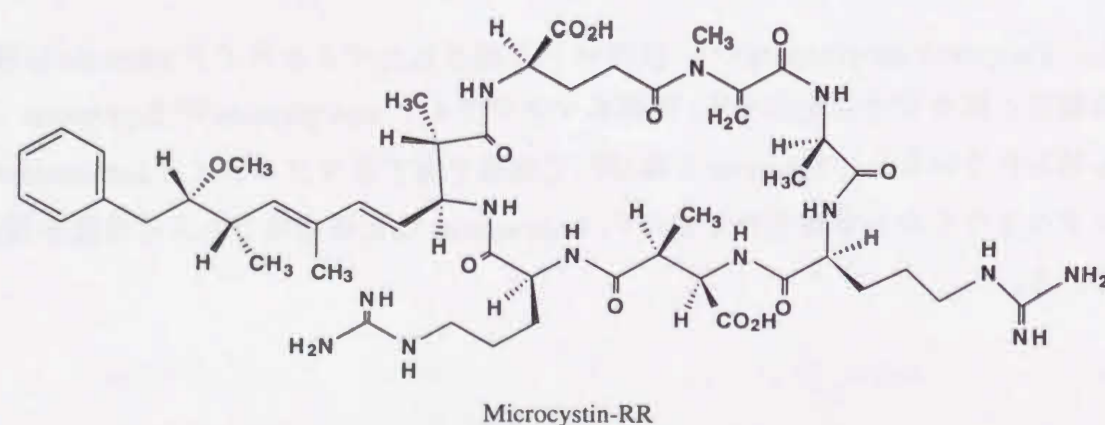


*Lyngbya majuscula* から発ガンプロモーターでプロテインキナーゼCを活性化するアルカロイドとして lyngbyatoxin A が 1979 年に単離されている<sup>9)</sup>。Lyngbyatoxin A の構造は放線菌が生産する発ガンプロモーター teleocidin B<sup>10)</sup>と類似している。

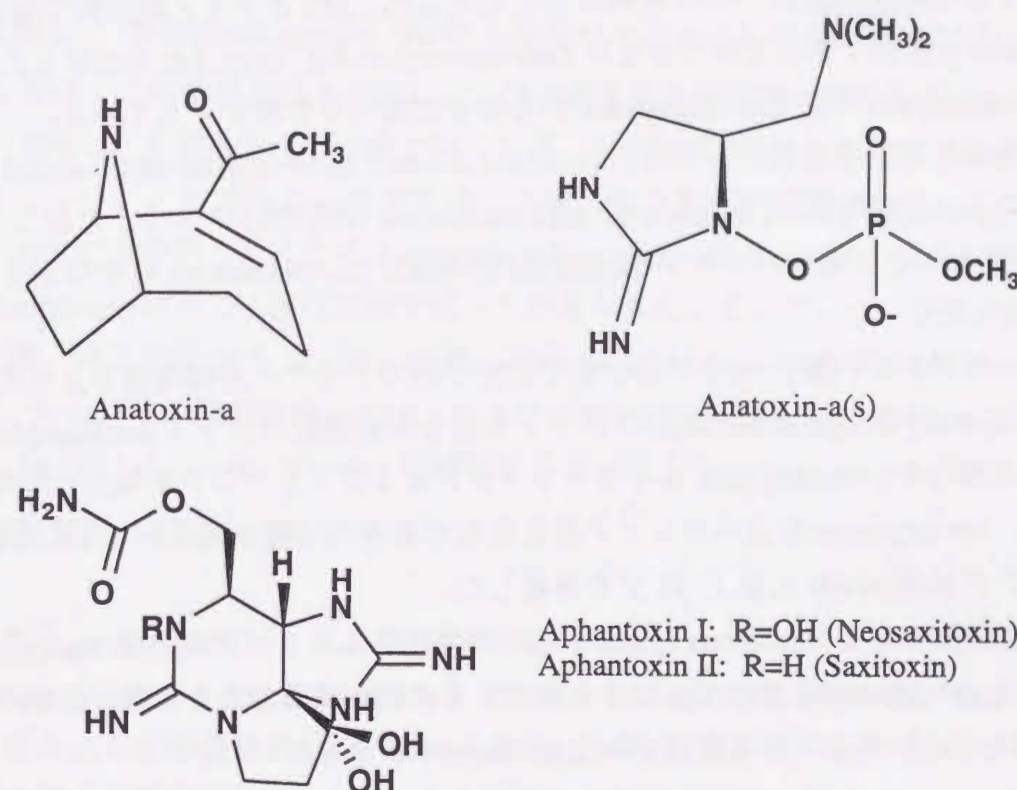


一方、淡水産の藍藻の場合は、富栄養化の進んだ湖沼などで有毒藍藻が異常増殖し、家畜や人に健康被害を及ぼす事故が世界各地で発生した。そのため、淡水産藍藻の有毒物質について精力的な研究が行われ、肝臓毒や神経毒が構造決定されてきた<sup>11)</sup>。

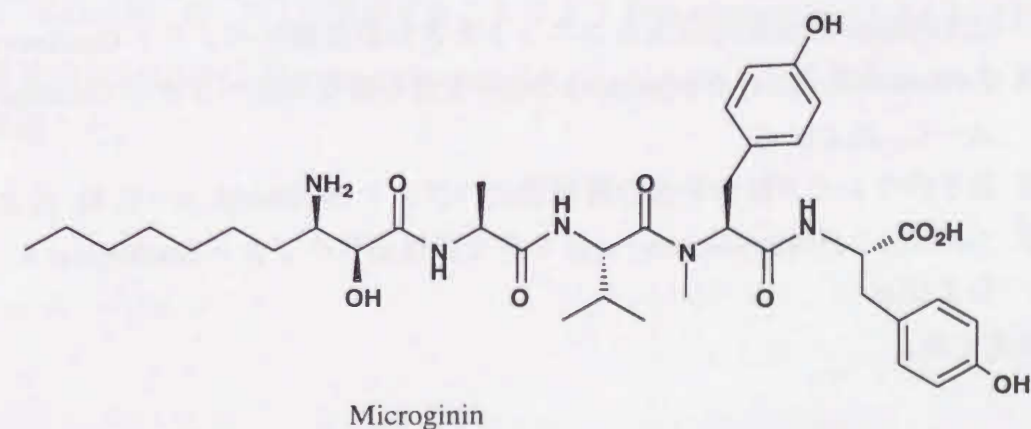
肝臓毒としては microcystin と呼ばれるアミノ酸7残基からなる環状ペプチドが、1984年に Botes らにより *Microcystis aeruginosa* から単離された<sup>12)</sup>。Microcystin は肝臓に特異的に取り込まれることが知られており、蛋白質脱リン酸化酵素の阻害作用を示し、オカダ酸と同様に発ガン促進作用がある。Microcystin は現在までに 50 種類以上の類縁体が知られている<sup>13)</sup>。



神経毒としては、*Anabaena* 属から Devlin らが単離したアルカロイド anatoxin-a<sup>14)</sup> や、Matsunaga らが 1989 年に単離したアルカロイドの anatoxin-a(s)<sup>15)</sup> がある。Anatoxin-a はアセチルコリンのレセプターに結合し、後シナプスの脱分極を阻害する。Anatoxin-a(s) はコリンエステラーゼを強力に阻害し、その LD50 値は 20  $\mu$ g/kg である。また、*Aphanizomenon* 属が生産する aphantoxin と呼ばれるアルカロイドは麻痺性貝毒の saxitoxin と neosaxitoxin の 9:1 混合物であった。



このように、淡水産藍藻の有毒物質については良く研究されてきたが、藍藻が生産する他の生理活性物質についてはあまり研究が行われてこなかった。最近になり、アオコを形成する主要藍藻の一つである *Microcystis* 属が生産する生理活性物質として、アンジオテンシン変換酵素阻害物質 microginin<sup>16)</sup>や蛋白質分解酵素阻害物質などが報告されている<sup>17)</sup>。





しかしながら、湖沼の富栄養化の進展に伴い *Microcystis* 属に代わり優占種となることが多くなってきた糸状藍藻 *Oscillatoria* 属についてはほとんど研究が行われていない。

そこで、本研究では、*Oscillatoria* 属の中でも優占種となることが多い *Oscillatoria agardhii* に注目し、その生理活性物質の検索を行うことを計画した。

*Oscillatoria* 属が生産する microcystin の構造を確認するために、*Oscillatoria agardhii* が生産する microcystin について解析を行ったところ、MS とアミノ酸分析では既存の microcystin と区別することができない Dhb-microcystin-RR, HtyR, LR を発見した。この Dhb-microcystin の発見は microcystin の分析法に重大な影響を与えている。

その他の生理活性物質としては、(3a-cis)-1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-3a-(3-methyl-2-butenyl)-pyrrolo[2,3-b]indol-2-carboxylic acid (oscillatoric acid, Osc) ユニットを含むアミノ酸 10 残基からなる環状ペプチド oscillatorin を単離した。Oscillatorin はキモトリプシンを阻害した。

また、グルタミン酸  $\gamma$ -セミアルデヒドが分子内でアセタール様構造をとった 3-amino-6-hydroxy-2-piperidone (Ahp) ユニットを含む新規環状ペプチド oscillapeptin A, B, C, G を単離した。Oscillapeptin はキモトリプシンおよびトリプシンを強力に阻害した。

更に、homotyrosine を含むウレイド結合を有するアミノ酸 6 残基からなる新規環状ペプチド oscillamide A, B, C, H, Y を単離した。

淡水産藍藻である *Oscillatoria agardhii* から塩素化された  $\beta$ -アミノ酸 3-amino-10-chloro-2-hydroxydecanoic acid (ClAhda) を含むアミノ酸 4 残基からなる新規鎖状ペプチド oscillagin A および脱塩素化された oscillagin B を単離した。

本研究では医薬品のリード化合物や生命科学解明の道具となりうる化合物の発見をめざして、淡水産藍藻 *Oscillatoria agardhii* の成分研究を行い、肝臓毒 microcystin と異常アミノ酸を含むペプチドについて新たな知見を得た。本論文においては、

第 2 章 2-Amino-2-butenic acid (Dhb) を含む新規 microcystin 類 Dhb-microcystin-RR, HtyR, および LR

第 3 章 異常アミノ酸 (3a-cis)-1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-3a-(3-methyl-2-butenyl)-pyrrolo[2,3-b]indol-2-carboxylic acid ユニットを含む新規環状ペプチド Oscillatorin

第 4 章 3-Amino-6-hydroxy-2-piperidone (Ahp) を含む新規環状ペプチド Oscillapeptin A~C, および G

第 5 章 分子内ウレイド結合を含む新規環状ペプチド Oscillamide A~C, H, および Y

第 6 章 3-Amino-2-hydroxydecanoic acid を含む新規鎖状ペプチド Oscillagin A および B

の順で詳述する。

## 第 2 章 2-Amino-2-butenic acid (Dhb) を含む新規 microcystin 類 Dhb-microcystin-RR, HtyR, および LR

### 第 1 節 Dhb-microcystin 類の単離

#### (1) Dhb-microcystin-RR の単離

*Oscillatoria agardhii* (NIES-610 = CCAP 1459/22 = NIVA CYA 18) を 10 L の培養瓶を用いて CT 培地中で通気培養を行い、1120 L の培地から凍結乾燥藻体 99.1 g を得た。凍結乾燥した *Oscillatoria agardhii* (NIES-610) 99.1 g から 8 L の  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 1 : 3 : 1$  を用いて可溶性成分を抽出した。抽出液を減圧乾固後、抽出物を 5 % 酢酸水溶液に懸濁し、不溶物を遠心分離で除いた後、Sep Pak ODS カートリッジに吸着させた。カートリッジを 20 % MeOH で洗浄した後、90 % MeOH で溶出した。この分画を逆相の HPLC で分析したところ 3-desmethylnicrocystin-RR とほぼ同じ保持時間のところに microcystin 様の UV 吸収を示すピークが見られた。そこで、この分画を減圧乾固した後、溶出物を 20 % MeOH に溶解し逆相 HPLC (Ultron ODS 20 x 250 mm ; 55 % MeOH、50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) および順相 HPTLC (Silica gel 60 F254, 0.25 mm,  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 60 : 40 : 10$ ) で精製することにより Dhb-microcystin-RR (1、7.5 mg、乾燥重量の 0.008 %) を単離した。

#### (2) Dhb-microcystin-HtyR および LR の単離

*Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/14) を CT 培地中で通気培養を行った。80 L の培養液から得られた乾燥藻体 7.7 g を 400 mL の MeOH に懸濁させ、可溶性成分を抽出した。抽出液を減圧下で濃縮した後、5 % 酢酸水溶液に抽出物を懸濁させた。遠心分離により不溶物を除いた後、遠心上清を Sep Pak ODS カートリッジに吸着させた。カートリッジから 20 % MeOH で溶出される分画を除いた後、90 % MeOH で溶出した。90 % MeOH 溶出画分を減圧乾固した後、溶出物を 20 % MeOH に溶解し、microcystin 様の UV 吸収を示す分画を逆相 HPLC (Mightysil ODS, 20 x 250 mm ; 65 % MeOH、50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) および順相 HPTLC (Silica gel 60 F254, 0.25 mm,  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 60 : 40 : 10$ ) で精製することにより Dhb-microcystin-HtyR (2、12.1 mg、乾燥重量の 0.2 %) および Dhb-microcystin-LR (3、9.4 mg、乾燥重量の 0.1 %) をそれぞれ単離した。



## 第2節 Dhb-microcystin-RR の構造解析

Dhb-microcystin-RR (**1**) は無色の固体で、HPLC での保持時間は 3-desmethylnicrocystin-RR とほぼ一致していた。また、UV スペクトルも microcystin 様の吸収を持ち、239 nm に極大吸収を示した。

正イオンモードの FABMS スペクトルでは、 $m/z$  1024 に疑似分子イオンピークが観察された (Fig. 2-5.)。高分解能 FABMS スペクトルで疑似分子イオンピークが  $m/z$  1024.5608 に観察されたことから、**1** の分子式は  $C_{48}H_{73}O_{12}N_{13}$  (calcd for  $M+H$ : 1024.5580,  $\Delta +2.8$  mmu) であることが明らかとなった。この分子式は desmethylnicrocystin-RR の分子式と一致していた。

**1** は  $^1H$ - および  $^{13}C$ -NMR スペクトルのデータ (Table 2-1.) からペプチドであることが推定されたので、**1** を酸加水分解 (6 M HCl, 110 °C, 20 hr) した後、GC/MS および Marfey 法によりアミノ酸組成を分析したところ、D-Ala、D-Asp、D-Glu、L-Arg が確認された。このアミノ酸組成も 3-desmethylnicrocystin-RR と一致していた<sup>18)</sup>。

しかしながら、**1** の  $^1H$ -NMR スペクトル (Fig. 2-6.) を 3-desmethylnicrocystin-RR と比較したところ、両スペクトルは明らかに異なることが明らかとなった。すなわち、Fig. 2-1.(B) に示すように、3-desmethylnicrocystin-RR では 5-6 ppm に *N*-methyl-dehydroalanine (MDha) に由来する 2 本の singlet (peaks b, c) が観察されるが、**1** (Fig. 2-1.(A)) では 2 本の singlet が消失し、かわりに 5.70 ppm に quartet が 1 組観察された。

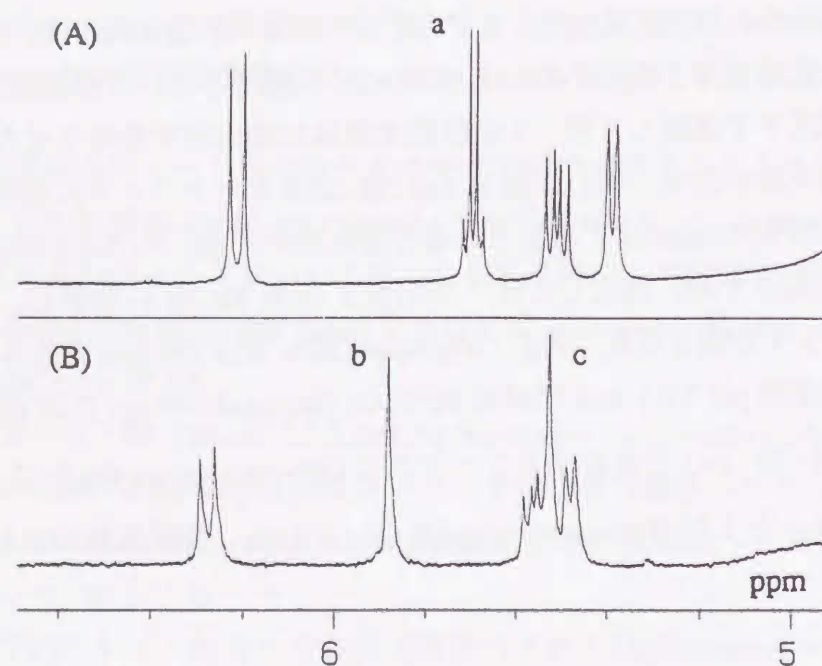


Fig. 2-1. Parts of the  $^1H$ -NMR spectra of **1** (A) and 3-desmethylnicrocystin-RR (B).

$^1H$ - $^1H$  COSY スペクトル (Fig. 2-8.) から、この quartet に由来する水素は 1.87 ppm の doublet のメチル基に隣接していることが明らかとなった。更に HMBC スペクトル (Fig. 2-10.) において、この 5.70 ppm の quartet は 166.8 および 132.1 ppm の炭素と、また 1.87 ppm の doublet は 123.5 および 132.1 ppm の炭素との間に相関ピークが観察された。これらの結果から、このユニットは 2-amino-2-butenic acid (dehydrobutyrine, Dhb) であることが明らかとなった (Fig. 2-2.(A))。

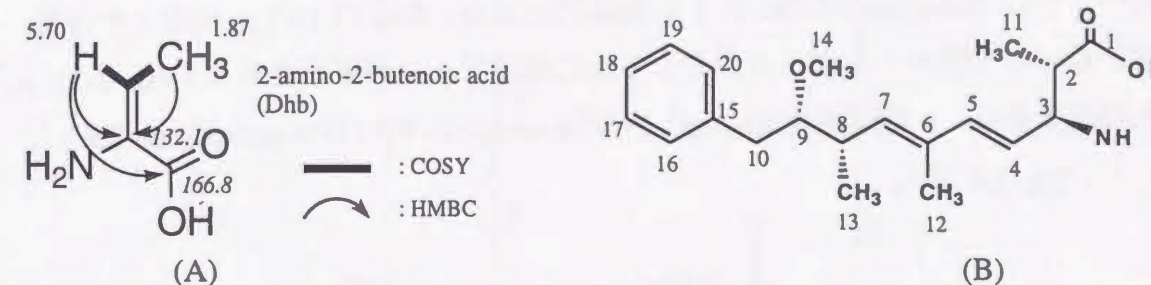


Fig. 2-2. Structures of 2-amino-2-butenic acid (Dhb) (A) and 3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid (Adda) (B).

更に、 $^1H$ - $^1H$  COSY および HMBC スペクトルを詳細に検討したところ、microcystin に共通に存在する 3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid (Adda) の存在を確認した (Fig. 2-2.(B))。Adda の立体配置については、その  $^1H$ - および  $^{13}C$ -NMR のデータが他の microcystin の値と良く一致していることから (2S,3S,8S,9S) であることが示された。

**1** のアミノ酸の配列は、主に HMBC スペクトル (Fig. 2-10.) において、 $\alpha$  位の水素とカルボニル炭素との相関ピークにより解析した (Fig. 2-3.)。Adda の  $\beta$  位の水素は Arg-2 のカルボニル炭素との間に相関ピークが観察されたことから、その結合を確認した。

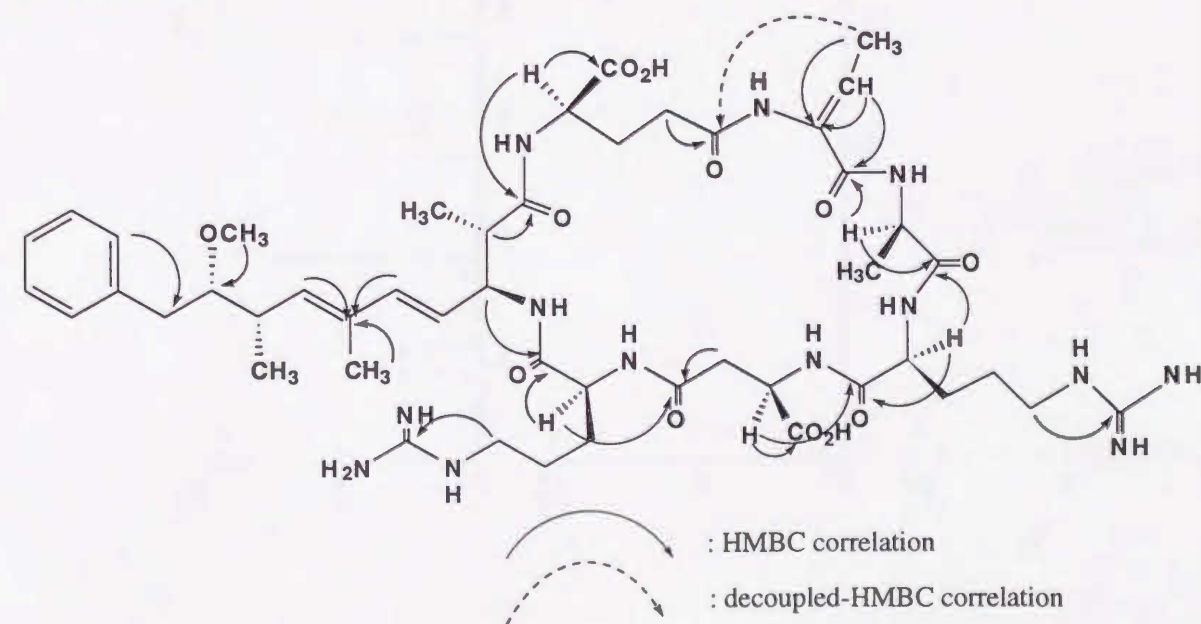


Fig. 2-3. HMBC and decoupled-HMBC correlations of **1**.



Dhbは $\alpha$ 位に水素がないために、DhbとGluとの結合は通常のHMBCスペクトルでは確認できなかった。これは、HMBCスペクトルが2結合あるいは3結合離れた水素-炭素間の相関しか測定できないためである。そこで、DMSO- $d_6$ 等の溶媒を用いてHMBCスペクトルの測定を行ったが、NHがbroadとなったために、その結合は確認できなかった。FurihataらはこのHMBCのパルスを改良して、結合定数の小さい4結合以上離れた相関ピークをも観測できる方法(decoupled-HMBC)を報告している<sup>19)</sup>。このdecoupled-HMBCを1に試みたところ、Dhbの1.87 ppmのメチル基の水素とGluの5位のカルボニル炭素との間に相関ピークが観察された(Fig. 2-11.)。

以上の結果から、1の構造を[D-Asp<sup>3</sup>, Dhb<sup>7</sup>]microcystin-RR (Dhb-microcystin-RR)と決定した(Fig. 2-4.)<sup>20)</sup>。

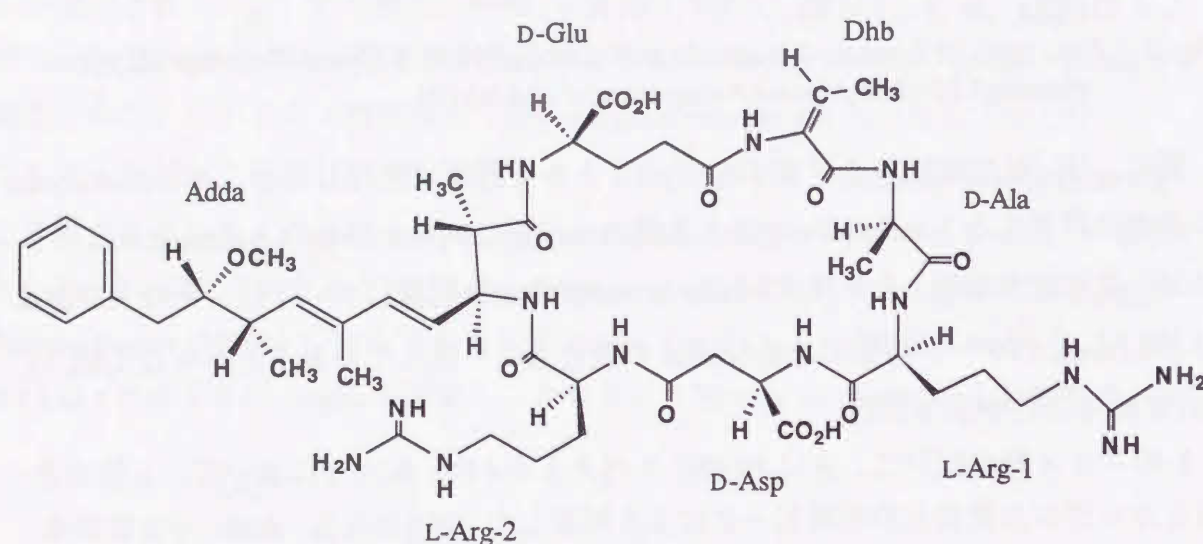


Fig. 2-4. Structure of Dhb-microcystin-RR (1).

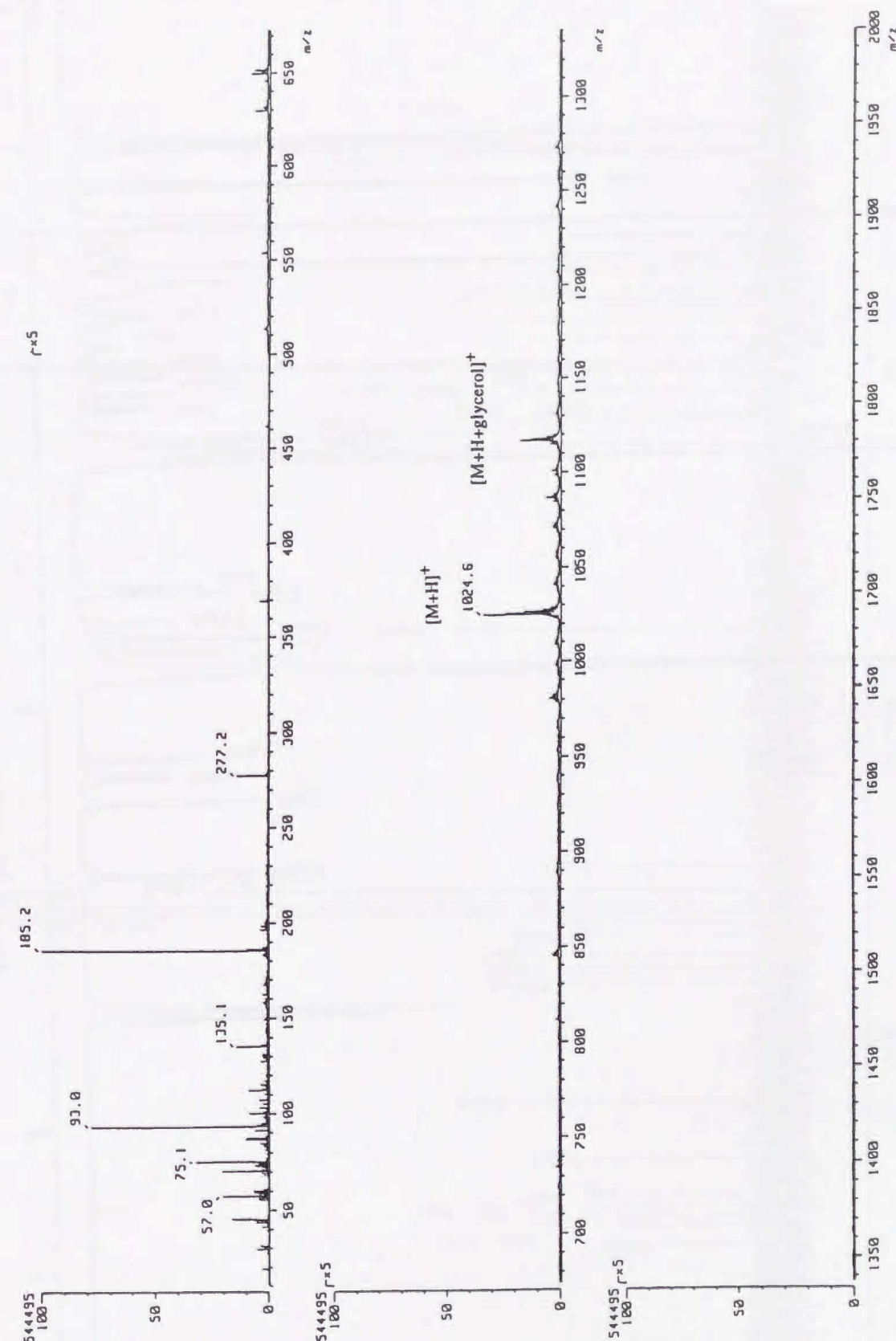


Fig. 2-5. Positive FAB/MS spectrum of 1 using glycerol as a matrix.



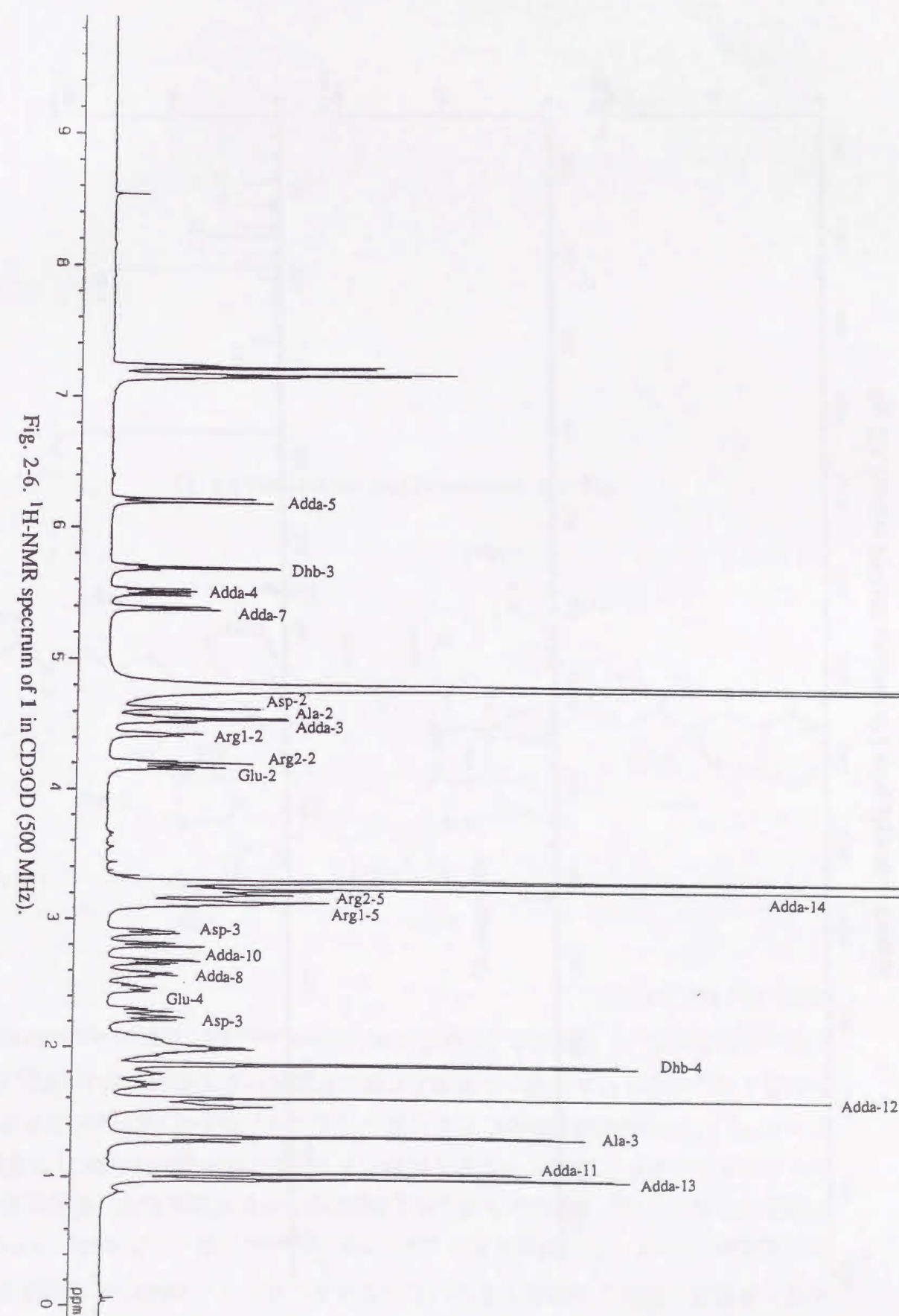
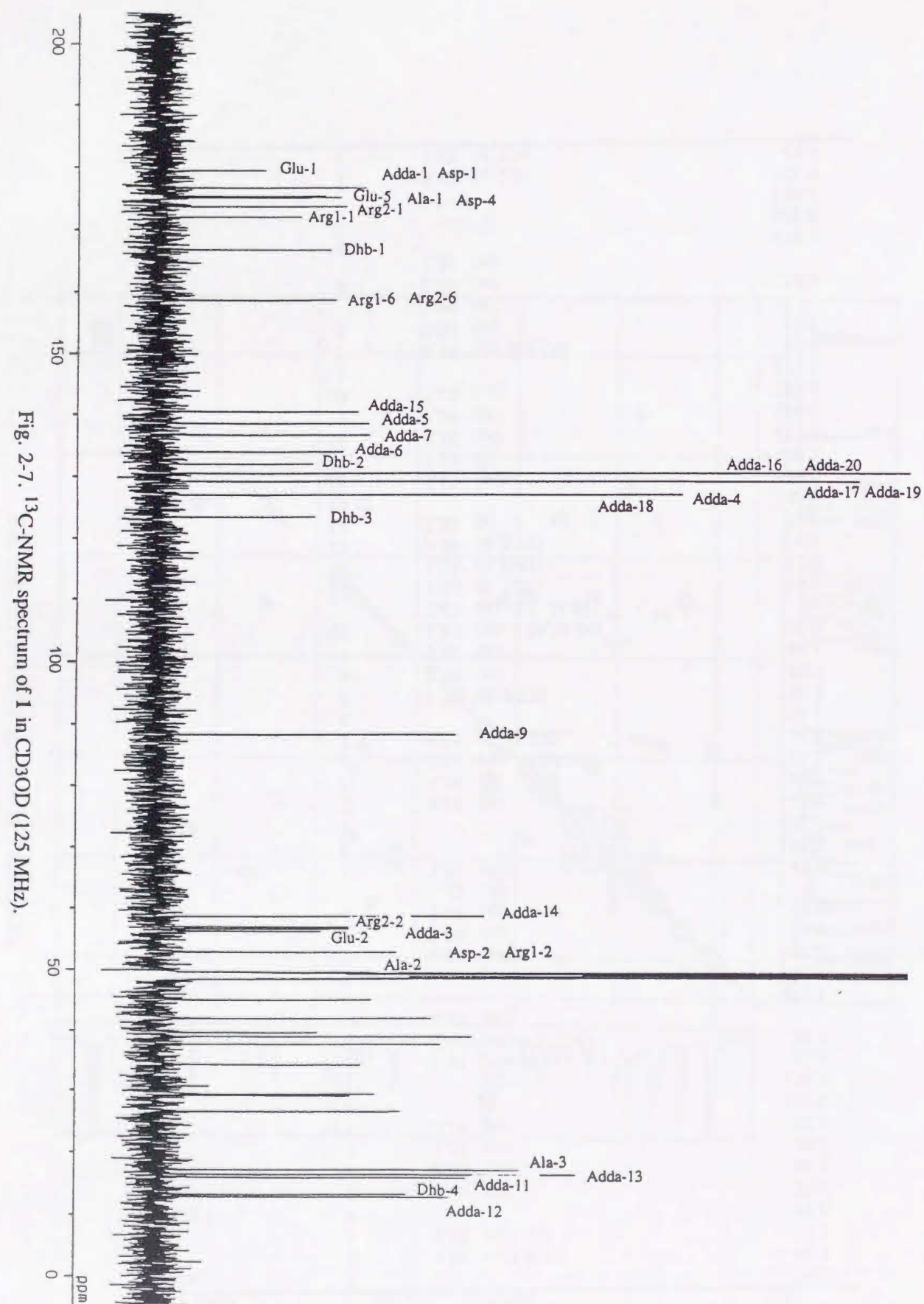


Table 2-1.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for Dhb-microcystin-RR in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Position	$^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$
Ala	1		175.2
	2	4.56 (t, 7.33)	49.7
	3	1.32 (d, 7.33)	17.3
Arg 1	1		172.0
	2	4.43 (m)	53.0
	3	2.03 (m)	29.2
	4	1.55 (m)	26.5
	5	3.14 (m)	42.0
Asp	6		158.6
	1		176.7
	2	4.64 (t, 4.27)	52.9
	3	2.90 (dd, 4.7, 13.6)	39.7
Arg 2	4	2.23 (m)	
	1		175.1
	2	4.21 (t, 7.5)	173.7
	3	2.00 (m)	57.0
	4	1.79 (m)	29.5
Adda	5	1.72 (m)	26.6
	6	3.21 (m)	42.0
	1		158.7
	2		176.7
	3	3.13 (m)	45.0
	4	4.54 (m)	56.7
	5	5.51 (dd, 8.85, 15.6)	127.1
	6	6.21 (d, 15.57)	138.6
	7		134.1
	8	5.39 (d, 9.77)	136.7
Glu	9	2.58 (m)	37.7
	10	3.26 (m)	88.4
	11	2.81 (dd, 4.88, 14.04)	39.0
	12	2.67 (dd, 7.2, 14.04)	
	13	1.04 (d, 7.02)	16.1
	14	1.61 (d, 0.91)	13.0
	15	0.99 (d, 6.71)	16.6
	16	3.23 (s)	58.7
	17		140.6
	18	7.17 (m)	130.6
Dhb	19	7.24 (m)	129.2
	20	7.15 (m)	127.1
	1	7.24 (m)	129.2
	2	7.17 (m)	130.6
	3		179.5
Dhb	4	4.18 (dd, 8.5, 7.0)	56.3
	5	2.08 (m)	29.5
	6	1.94 (m)	
	7	2.47 (m)	34.3
Dhb	8	2.28 (m)	
	1		175.4
	2		166.8
	3	5.70 (q, 7.3)	132.1
Dhb	4	1.87 (d, 7.3)	123.5
	5		13.4

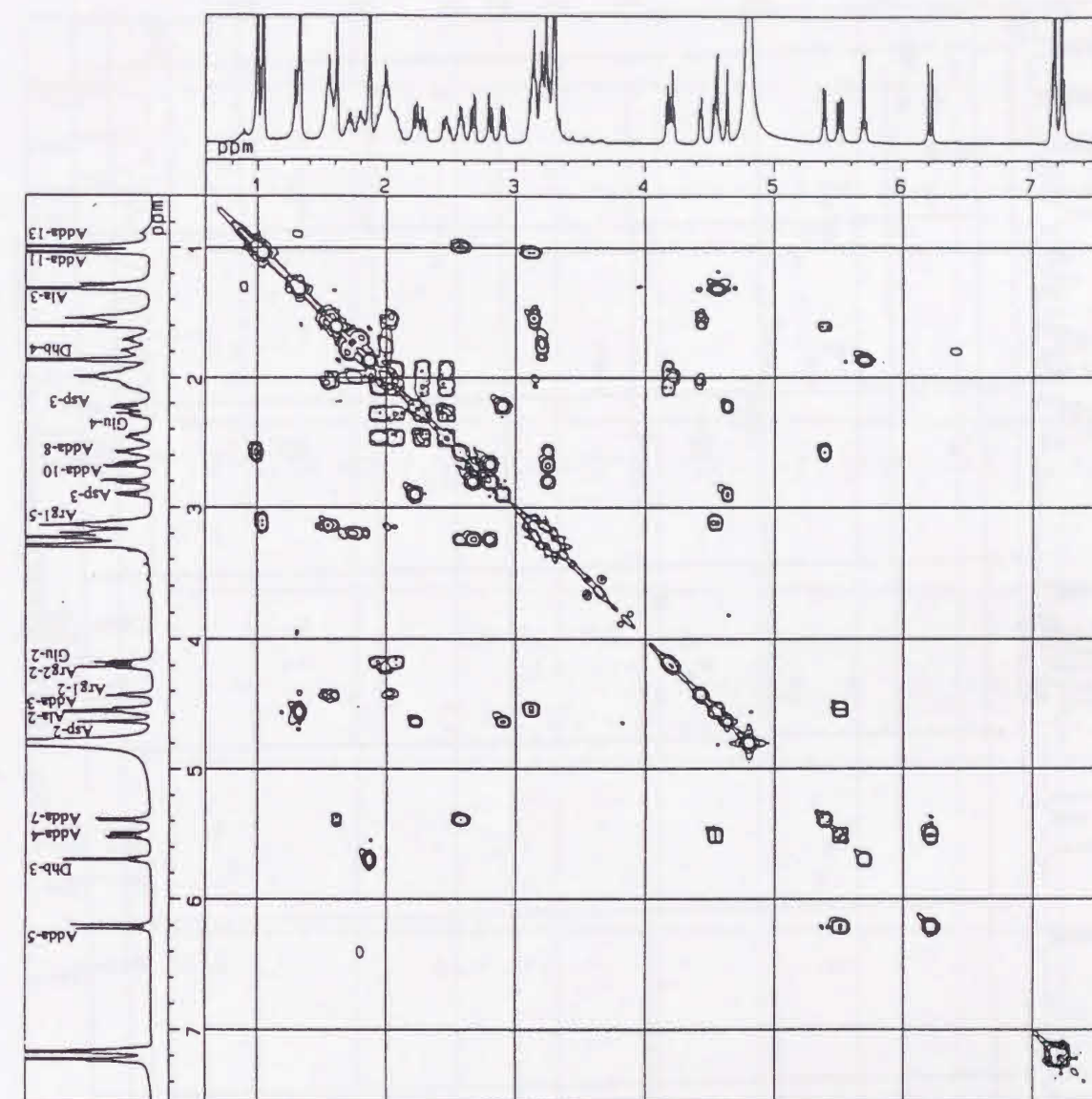


Fig. 2-8.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum of 1 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



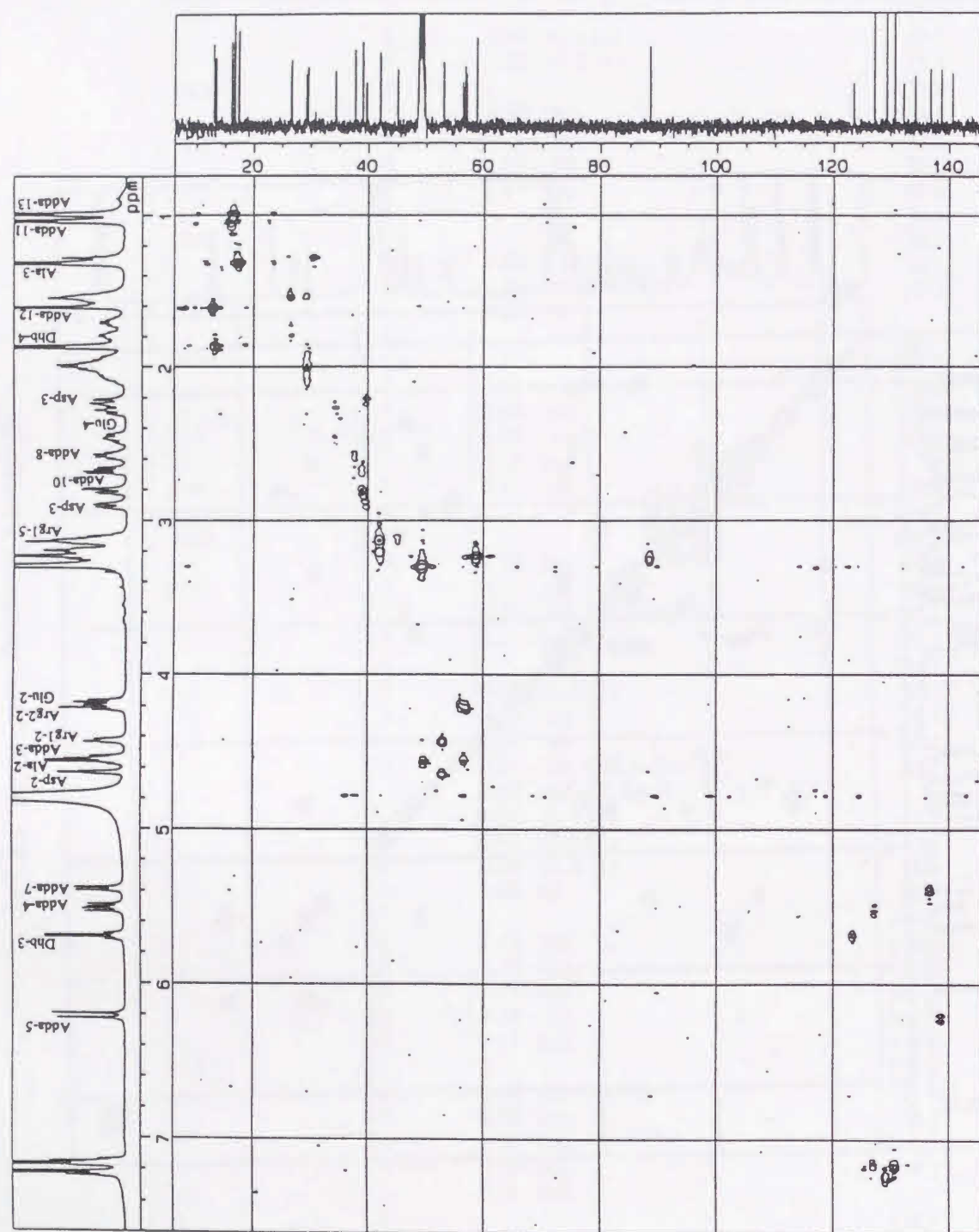


Fig. 2-9.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spectrum of **1** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

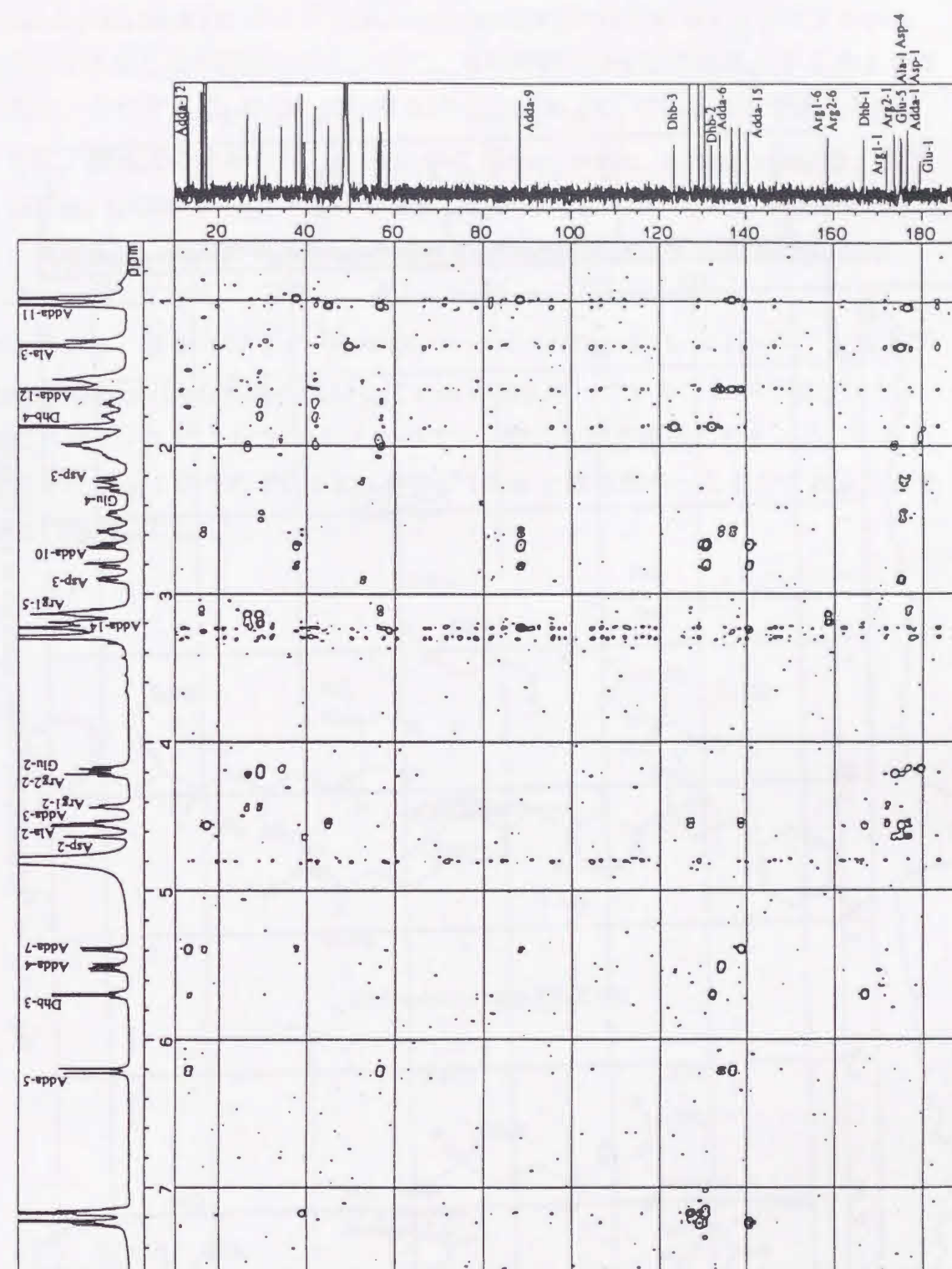


Fig. 2-10.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spectrum of **1** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



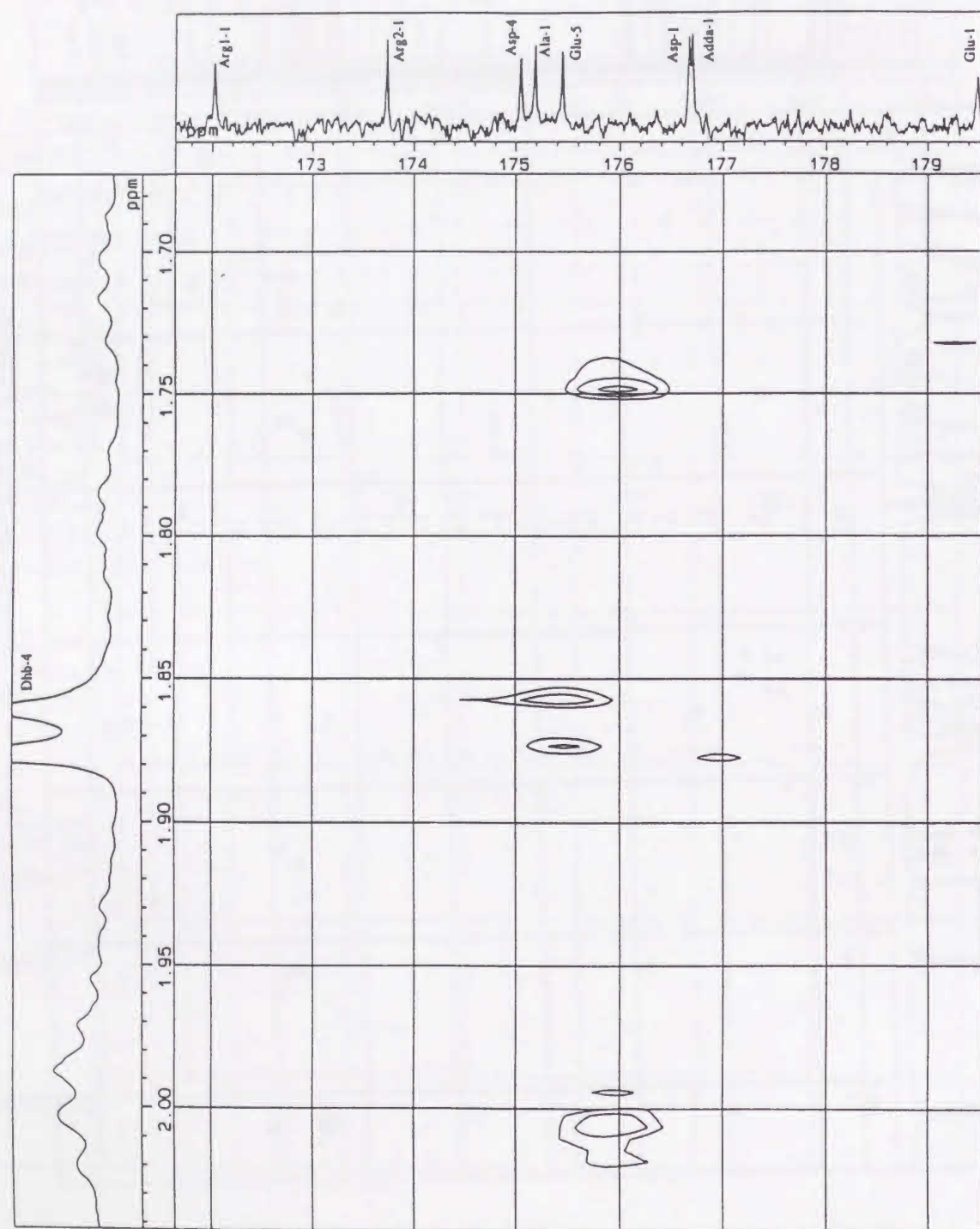


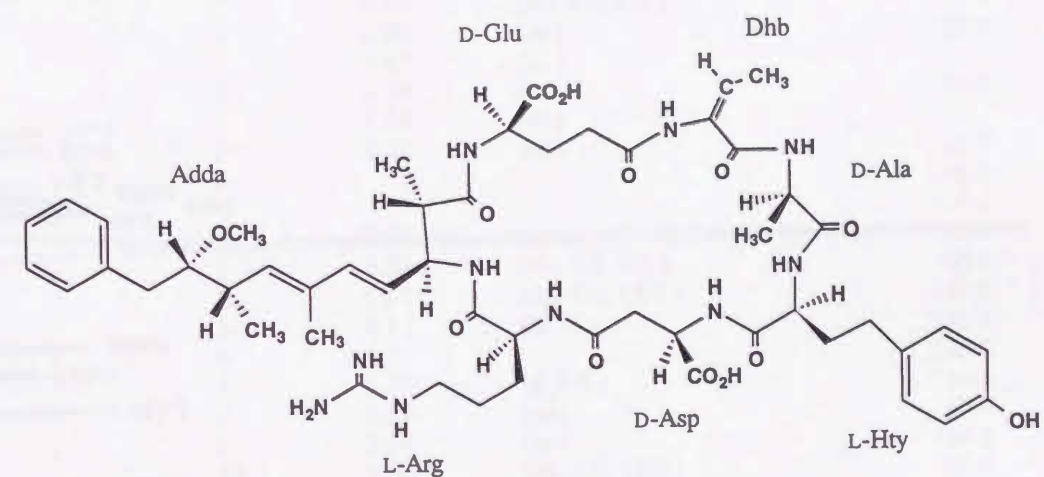
Fig. 2-11.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  decoupled-HMBC spectrum of **1** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

### 第3節 Dhb-microcystin-HtyR および LR の構造解析

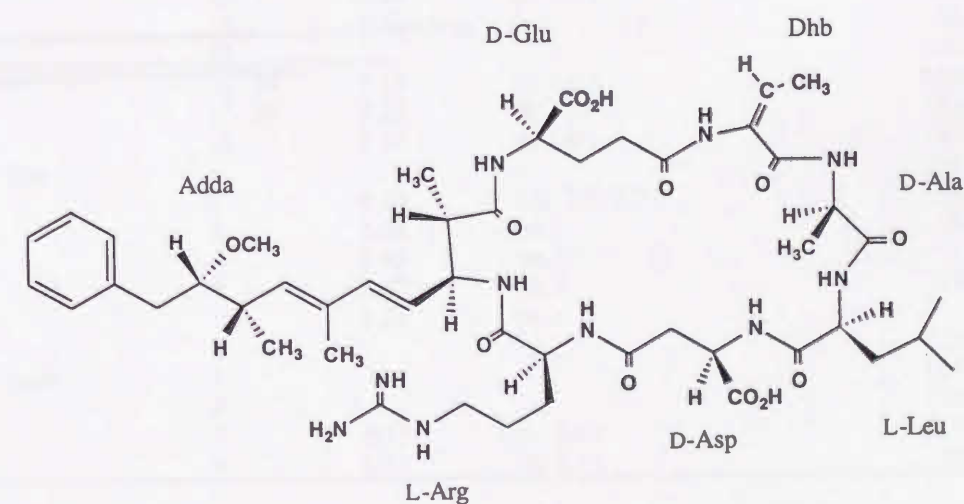
Dhb-microcystin-HtyR (**2**) および Dhb-microcystin-LR (**3**) はその UV スペクトルから microcystin であることが示唆された。また、高分解能 FABMS の結果より **2** および **3** の分子式は、それぞれ  $\text{C}_{52}\text{H}_{72}\text{N}_{10}\text{O}_{13}$  および  $\text{C}_{48}\text{H}_{72}\text{N}_{10}\text{O}_{12}$  であることが示された。更に、アミノ酸組成の分析から、**2** は D-Ala、D-Asp、D-Glu、L-Arg、L-Hty を、**3** は D-Ala、D-Asp、D-Glu、L-Arg、L-Leu を含むことが確認された。これらの分子式およびアミノ酸組成は、それぞれ 3-desmethylnmicrocystin-HtyR および 3-desmethylnmicrocystin-LR と一致した。

しかしながら、**2** および **3** の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル (Fig. 2-13, 14) から、**2** および **3** も dehydroalanine (Dha) 残基の代わりに Dhb 残基を持っていることが示唆された。

HMBC スペクトルにより **2** および **3** のアミノ酸の配列を解析したところ、**2** および **3** は **1** の L-Arg-1 がそれぞれ L-Hty および L-Leu と置き換わったものであることを確認した (Fig. 2-12.)。



Dhb-microcystin-HtyR (**2**)



Dhb-microcystin-LR (**3**)

Fig. 2-12. Structures of Dhb-microcystin-Hty (**2**) and LR (**3**).



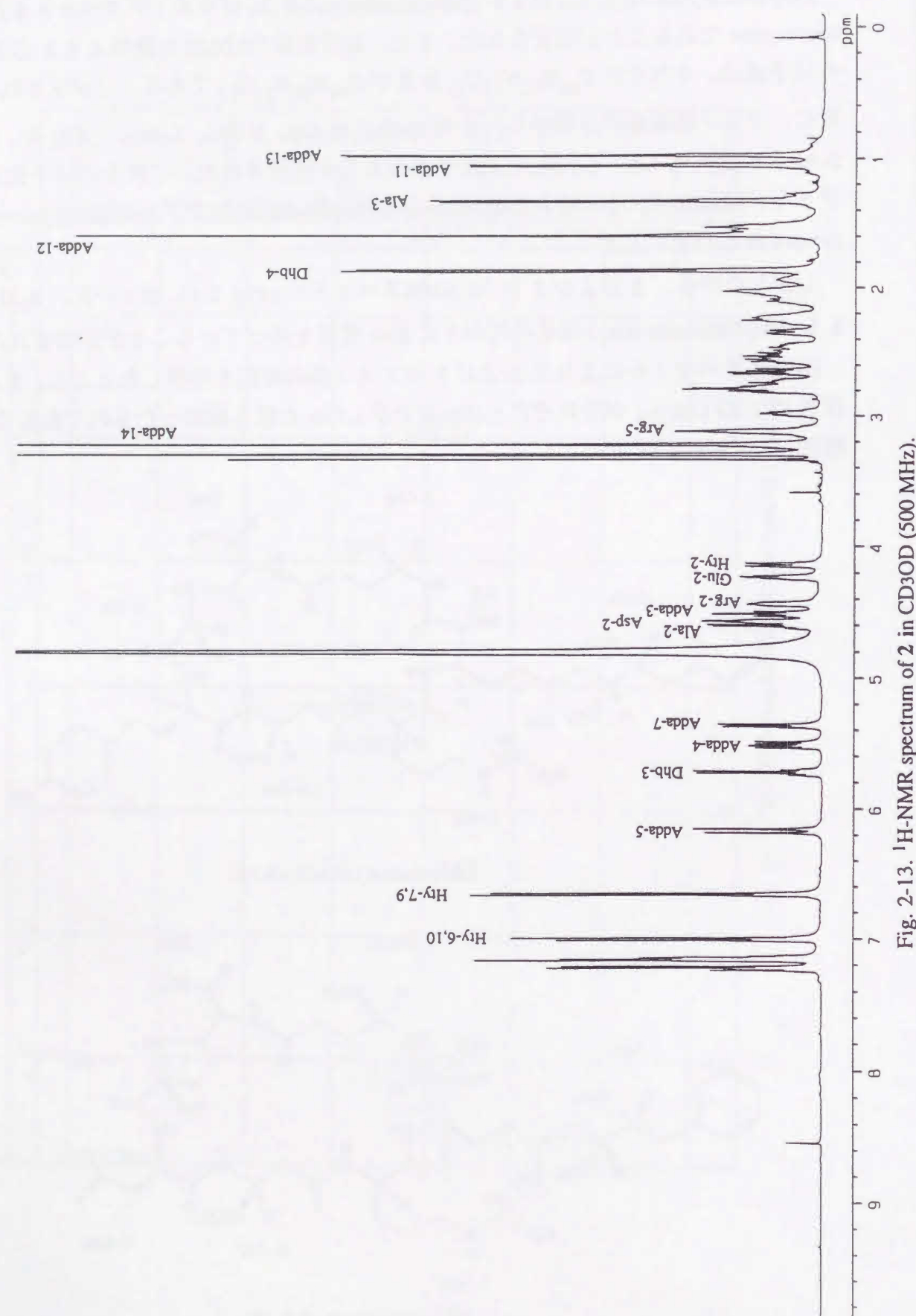


Fig. 2-13.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of 2 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).

Table 2-2.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for Dhb-microcystin-HtyR in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Position		$^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$
Ala	1			175.5
	2	4.61	(q, 7.0)	49.7
	3	1.34	(d, 7.0)	17.4
Hty	1			174.4
	2	4.14	(dd, 3.7, 11.3)	56.0
	3	2.24	(m)	34.1
		2.10	(m)	
	4	2.73	(m)	32.6
		2.52	(m)	
	5			133.2
Asp	6, 10	7.01	(d, 8.5)	130.7
	7, 9	6.66	(d, 8.5)	116.2
	8			156.6
	1			176.8
	2	4.57	(t, 4.6)	53.2
	3	2.77	(m)	39.8
		2.34	(m)	
Arg	4			175.1
	1			172.4
	2	4.44	(dd, 4.0, 8.5)	52.9
	3	2.03	(m)	28.8
		1.53	(m)	
	4	1.58	(m)	26.3
		1.54	(m)	
Adda	5	3.12	(m)	41.7
	6			158.6
	1			176.4
	2	2.98	(m)	45.0
	3	4.52	(dd, 8.6, 9.2)	56.4
	4	5.51	(dd, 8.6, 15.6)	127.0
	5	6.17	(d, 15.6)	138.2
	6			134.0
	7	5.37	(d, 8.8)	136.8
	8	2.57	(m)	37.7
	9	3.24	(m)	88.4
	10	2.80	(dd, 4.9, 14.0)	39.0
		2.65	(dd, 7.3, 14.0)	
	11	1.06	(d, 7.0)	16.2
	12	1.60	(s)	13.0
Glu	13	0.99	(d, 7.0)	16.6
	14	3.22	(s)	58.7
	15			140.6
	16, 20	7.16	(d, 7.0)	130.5
	17, 19	7.23	(t, 7.0)	129.2
	18	7.15	(t, 7.0)	127.0
	1			179.2
Dhb	2	4.24	(dd, 5.8, 9.2)	56.1
	3	2.03	(m)	29.9
		1.95	(m)	
	4	2.47	(m)	34.2
		2.26	(m)	
Dhb	5			175.3
	1			166.7
	2			132.0
	3	5.73	(q, 7.3)	123.8
	4	1.87	(d, 7.3)	13.5

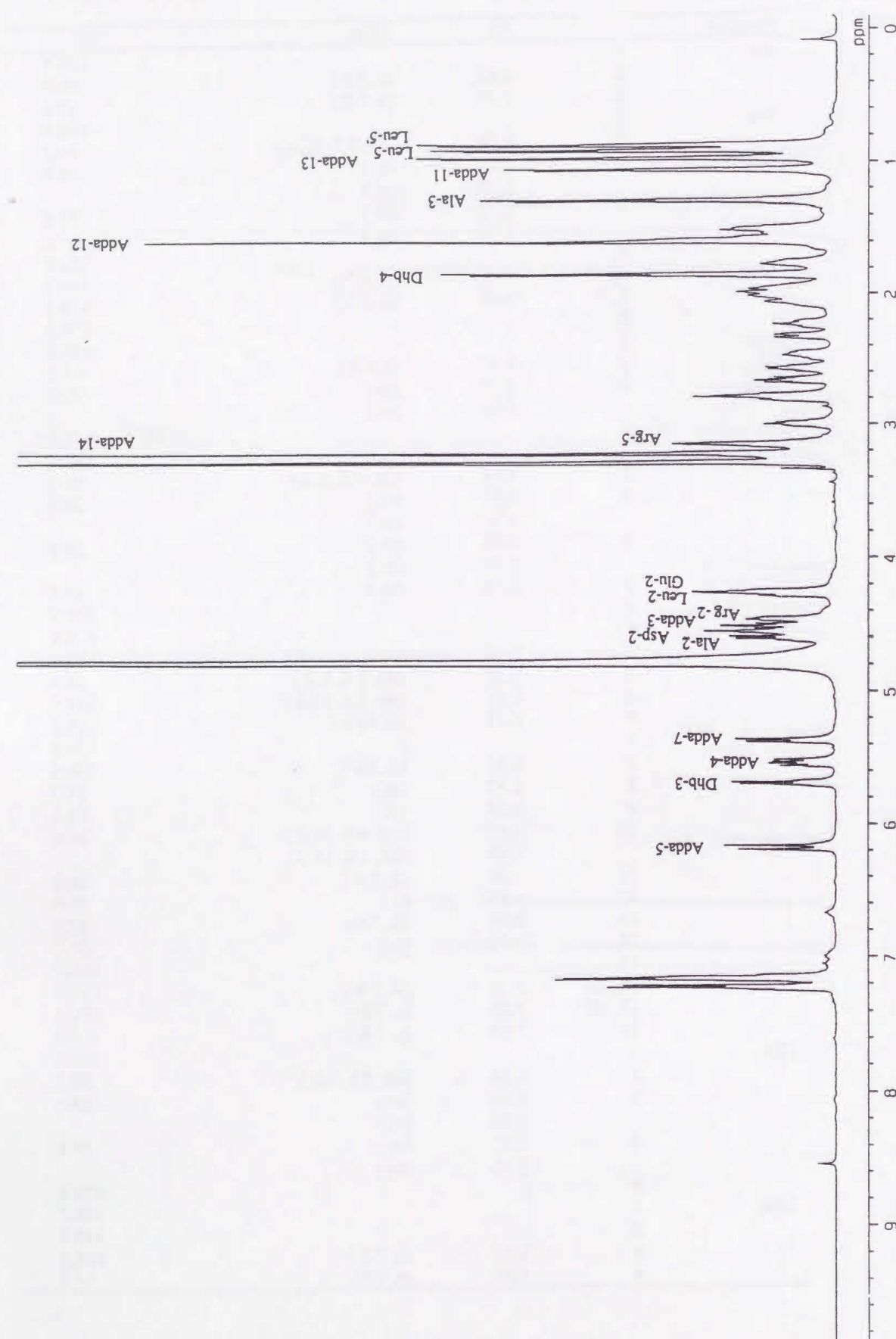


Fig. 2-14.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of 3 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).

Table 2-3.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for Dhb-microcystin-LR in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Position	$^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$
Ala	1		175.3
	2	4.61 (q, 7.0)	49.5
	3	1.31 (d, 7.0)	17.5
Leu	1		174.7
	2	4.28 (dd, 3.9, 11.6)	55.1
	3	2.03 (m)	29.9
		1.92 (m)	
	4	1.78 (m)	26.0
Asp	5	0.93 (d, 6.7)	23.8
	5'	0.89 (d, 6.4)	21.3
	1		176.7
	2	4.56 (t, 4.8)	53.3
	3	2.79 (m)	39.8
Arg		2.33 (m)	
	4		175.0
	1		172.4
	2	4.48 (dd, 4.3, 9.0)	52.7
	3	2.07 (m)	28.7
Adda		1.52 (m)	
	4	1.60 (m)	26.0
		1.49 (m)	
	5	3.15 (m)	41.4
	6		158.7
	1		176.4
	2	3.00 (m)	45.0
	3	4.52 (t, 9.5)	56.5
	4	5.37 (dd, 9.5, 15.6)	127.1
	5	6.18 (d, 15.6)	138.2
	6		134.1
	7	5.37 (d, 9.8)	136.7
	8	2.58 (m)	37.7
	9	3.24 (m)	88.4
	10	2.82 (m)	39.0
Glu		2.67 (dd, 7.2, 13.9)	
	11	1.08 (d, 7.0)	16.1
	12	1.62 (s)	13.0
	13	0.99 (d, 6.7)	16.6
	14	3.23 (s)	58.7
	15		140.6
	16, 20	7.18 (d, 6.7)	130.5
	17, 19	7.24 (dd, 6.7, 7.6)	129.2
	18	7.16 (t, 7.6)	127.0
	1		179.3
Dhb	2	4.27 (dd, 5.8, 9.2)	56.0
	3	1.99 (m)	40.6
		1.59 (m)	
	4	2.47 (m)	34.4
		2.23 (m)	
Dhb	5		175.3
	1		166.5
	2		132.0
	3	5.69 (q, 7.3)	123.8
	4	1.86 (d, 7.3)	13.5



#### 第4節 Dhb-microcystin の生理活性

Microcystin は肝臓毒であり、急性の致死毒性をも示すことが知られている。Dhb-microcystin-RR について、急性毒性を調べたところ、400  $\mu\text{g/kg}$  を6週令の雄マウスの腹腔内に投与したところ、5時間以内に全てのマウスが死亡した。

また、Dhb-microcystin-RR の HL-60 細胞に対する細胞毒性を調べたところ、Dhb-microcystin-RR を培養液に加えただけでは 100  $\mu\text{g/mL}$  でも増殖阻害を起こさなかったが、エレクトロポレーション処理を行うことにより増殖阻害が見られた<sup>21)</sup>。Dhb-microcystin-RR, HtyR, LR および microcystin-LR の  $\text{ID}_{50}$  値は、それぞれ 1.2、2.1、1.7 および  $2.5 \times 10^{-5}$  M であった。

#### 第5節 考察

Dhb-microcystin-RR, HtyR, LR は microcystin の *N*-methyldehydroalanine (MDha) 残基が 2-amino-2-butenic acid (Dhb) 残基に置き代わった化合物である。Microcystin は、現在までに 50 種類以上の構造類似体が知られている<sup>12), 22)-27)</sup>。これらの microcystin の分析において、特に試料が微量の場合には、HPLC による分離後、MS およびアミノ酸組成の分析により解析されることが多かった。その中でも、HPLC/MS を用いる方法は microcystin の分析法として優れていると考えられていた<sup>28)</sup>。しかしながら、今回発見した Dhb-microcystin は microcystin の desmethyl 体と同一の分子式を持ち、HPLC の保持時間もほぼ同一、アミノ酸組成も 3-desmethyl 体とは同一であるという特徴を持っている。今回、Dhb-microcystin が発見されたことにより、NMR による構造解析なしには、microcystin の構造、特に 3-desmethyl 体の構造は決定できない場合が多いことが明らかとなった。本論文には記載していないが、著者らは Adda 残基のメトキシ基がアセトキシ基に置換された Dhb-microcystin を藍藻 *Nostoc* 属から単離しており、microcystin の分析には NMR による構造解析が不可欠であることが示唆された。

前節までに示した様に microcystin には HPLC/MS を用いても構造が解析できない誘導体が多数存在することから、microcystin を定量しようとする場合、それぞれの誘導体を分離するのではなく microcystin の総量を測定する方法が考えられている。ELISA もそのひとつである<sup>29)</sup>が、ELISA には抗体の抗原特異性という問題があり、全ての microcystin 誘導体を同じ感度では測定できないという欠点がある。我々は、microcystin に共通に存在する Adda 残基を  $\text{KMnO}_4/\text{KIO}_4$  を用いて酸化し、2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutanoic acid (MMPB) 誘導体とした後、GC あるいは HPLC で定量する方法を開発している<sup>30)</sup>。本方法では ng レベルの microcystin を定量することができる。

マウスを用いた *in vivo* での microcystin の急性毒性試験では、microcystin-LR の毒性が最も強いとされており ( $\text{LD}_{50} = 50 \mu\text{g/kg}$ )、RR 誘導体は毒性が数倍弱いと報告されている。また、desmethyl 誘導体も毒性が弱いと報告されている<sup>28)</sup>。しかしながら、今回、HL-60 細胞を用いて細胞毒性試験を行ったところ、Dhb-microcystin-RR は microcystin-LR よりも細胞毒性が強いことが確認された。このことから、動物に対する致死毒性と細胞毒性とでは毒性発現メカニズムに違いがあることが考えられる。



第3章 異常アミノ酸 (3a-cis)-1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-3a-(3-methyl-2-butenyl)-pyrrolo-[2,3-b]indol-2-carboxylic acid ユニットを含む新規環状ペプチド Oscillatorin

第1節 Oscillatorin の単離

*Oscillatoria agardhii* (NIES-610 = CCAP 1459/22 = NIVA CYA 18) を 1120 L の CT 培地を用いて通気培養し、99.1 g の凍結乾燥藻体を得た。得られた乾燥試料 99.1 g に 8 L の  $\text{CHCl}_3$  : MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  = 1 : 3 : 1 を加えて攪拌し、遠心分離により抽出液を得た。得られた抽出液を減圧下濃縮後、5 % 酢酸水溶液に懸濁し、不溶物を遠心分離で除いた。遠心上清を Sep Pak ODS カートリッジに吸着させ、20 % MeOH で洗浄した。カートリッジから 90 % MeOH で溶出される画分を減圧乾固した後、20 % MeOH に溶解し逆相 HPLC (Purosphere ODS, 20 x 250 mm ; 75 % MeOH、50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) で精製することにより oscillatorin (4、8.5 mg、乾燥重量の 0.009 %) を単離した。

第2節 Oscillatorin の構造解析

Oscillatorin (4) は無色の固体で、UV スペクトルは 283 nm に極大吸収 ( $\log \epsilon$  3.4) を示した。正イオンモードの FABMS スペクトル (Fig. 3-4.) では、 $m/z$  1240 に疑似分子イオンピークが観察された。高分解能 FABMS スペクトル ( $m/z$  1240.6456,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) により、分子式は  $\text{C}_{60}\text{H}_{85}\text{O}_{14}\text{N}_{15}$  (calcd for  $\text{M}+\text{H}$ : 1240.6478,  $\Delta$  -2.2 mmu) と決定した。

$^1\text{H}$ - および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル データ (Table 3-1.) から 4 はペプチドであることが示唆された。また、4 はニンヒドリン試薬には陰性であったことから、環状になっているか N 末端が修飾されていることが示唆された。4 を酸加水分解後 (6 M HCl, 110 °C, 20 hr)、N-trifluoroacetyl isopropyl ester 誘導体に誘導し、GC/MS により構成アミノ酸を分析したところ、valine (Val), glutamic acid (Glu), proline (Pro), glycine (Gly), aspartic acid (Asp), leucine (Leu), tyrosine (Tyr), arginine (Arg) が確認された。また、HPLC および chiral な GC カラムを用いた分析からこれらのアミノ酸は、全て L 型であることを確認した。

4 の NMR スペクトルから、一般的なアミノ酸の他に、一個の異常アミノ酸が含まれていることが示唆された。 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルにおいて 1.56 および 1.64 ppm に singlet のメチル基水素が観察された。これらは、HMBC スペクトル (Fig. 3-9.) において 120.1 および 135.1 ppm の炭素と相関ピークが観察された。HSQC スペクトル (Fig. 3-7.) において、120.1 ppm の炭素には 5.05 ppm のオレフィン水素が結合していることが確認された。この水素は 2.49 および 2.42 ppm の水素と  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトル (Fig. 3-8.) において相関ピークが観察された。以上の結果から、イソブレンユニットの存在を確認した。 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトルと HMBC スペクトルを詳細に

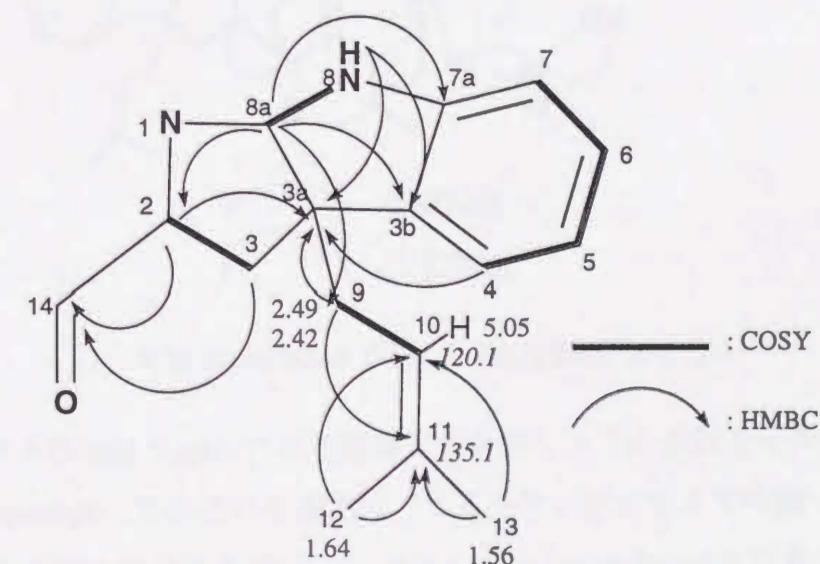


Fig. 3-1. Structure of oscillatoric acid unit.



検討したところ、このイソプレニユニットは 1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-3a-pyrrolo[2,3-b]-indol-2-carboxylic acid に 3a 位で結合していることが明らかとなった (Fig. 3-1.)。この異常アミノ酸残基は tryptophane の分子内環化反応とイソプレニユニットの付加により生合成されていると思われる。また、その ROESY スペクトルから、H-8a と 3-methyl-2-butenyl の立体配置は physostigmine<sup>31)</sup> と同様に *cis* であることが示唆された。以上の結果より、この異常アミノ酸は (3a-*cis*)-1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-3a-(3-methyl-2-butenyl)-pyrrolo[2,3-b]indol-2-carboxylic acid (oscillatoric acid, Osc) であることが明らかとなった。Oscillatoric acid の立体構造については現在検討中である。

4 のアミノ酸配列は主に、HMBC スペクトルにおいて、 $\alpha$ -NH とカルボニル炭素との相関ピークにより確認した。Osc と Leu との結合は Osc の 8a 位水素と Leu のカルボニル炭素との相関ピークにより確認した (Fig. 3-2.)。Pro と Val との結合は、Pro の 5 位水素と Val のカルボニル炭素との相関ピークにより確認した。Arg と Glu および Glu と Asn との結合は ROESY スペクトルにより確認した (Fig. 3-2.)。

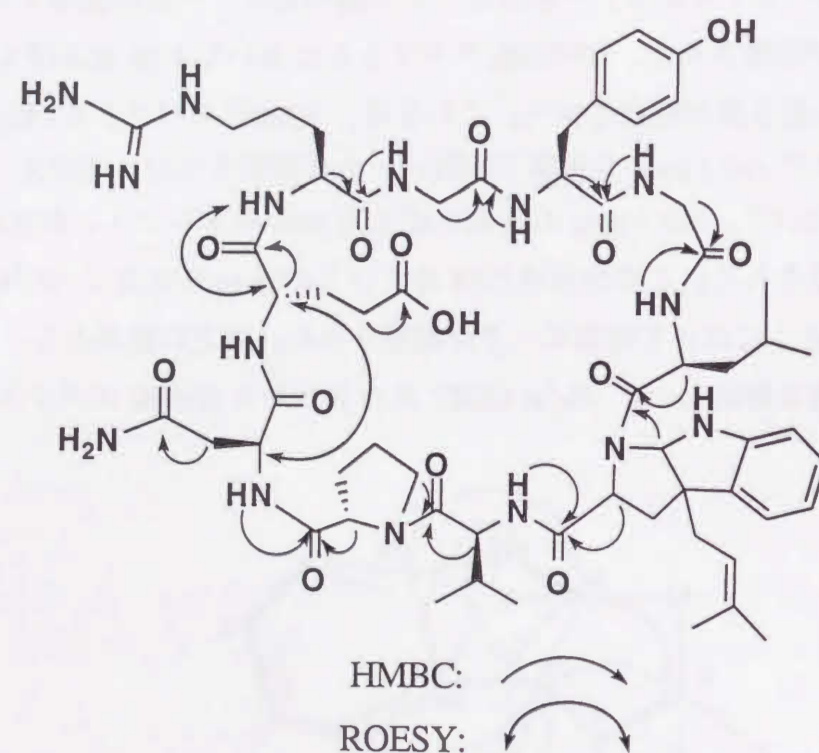


Fig. 3-2. HMBC and ROESY correlations of 4.

また、4 はその分子式からアミノ酸分析で確認された Asp と Glu のうち、どちらかの  $\omega$ -カルボン酸がアミドとなっていることが示唆されたので、diphenylphosphonic azide (DPPA)<sup>32)</sup> 及び [bis(trifluoroacetoxy)-iodo]benzene<sup>33)</sup> との反応を試みたが、確認には至らなかった。そこで、pH を変化させ NMR スペクトルを測定することにより、

アミドの確認を試みた。中性あるいは塩基性では、Glu の H-4 の化学シフトは 2.3 ppm であったが酸性条件下では 2.5 ppm にシフトした。同一条件下で Asn の H-3 の化学シフトは全く変化が見られなかった。このことから、アミノ酸分析で Asp として検出されたアミノ酸残基は 4 分子内では Asn となっていることを確認した。

以上の結果より、oscillatorin (4) の構造を Fig. 3-3. のように決定した<sup>34)</sup>。

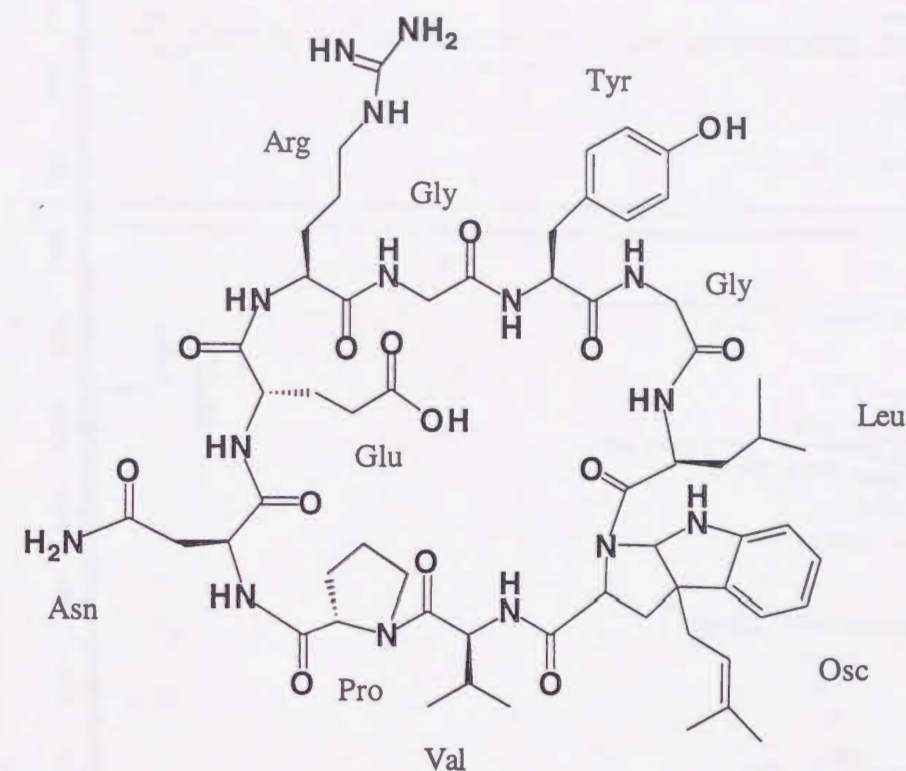


Fig. 3-3. Structure of oscillatorin (4).

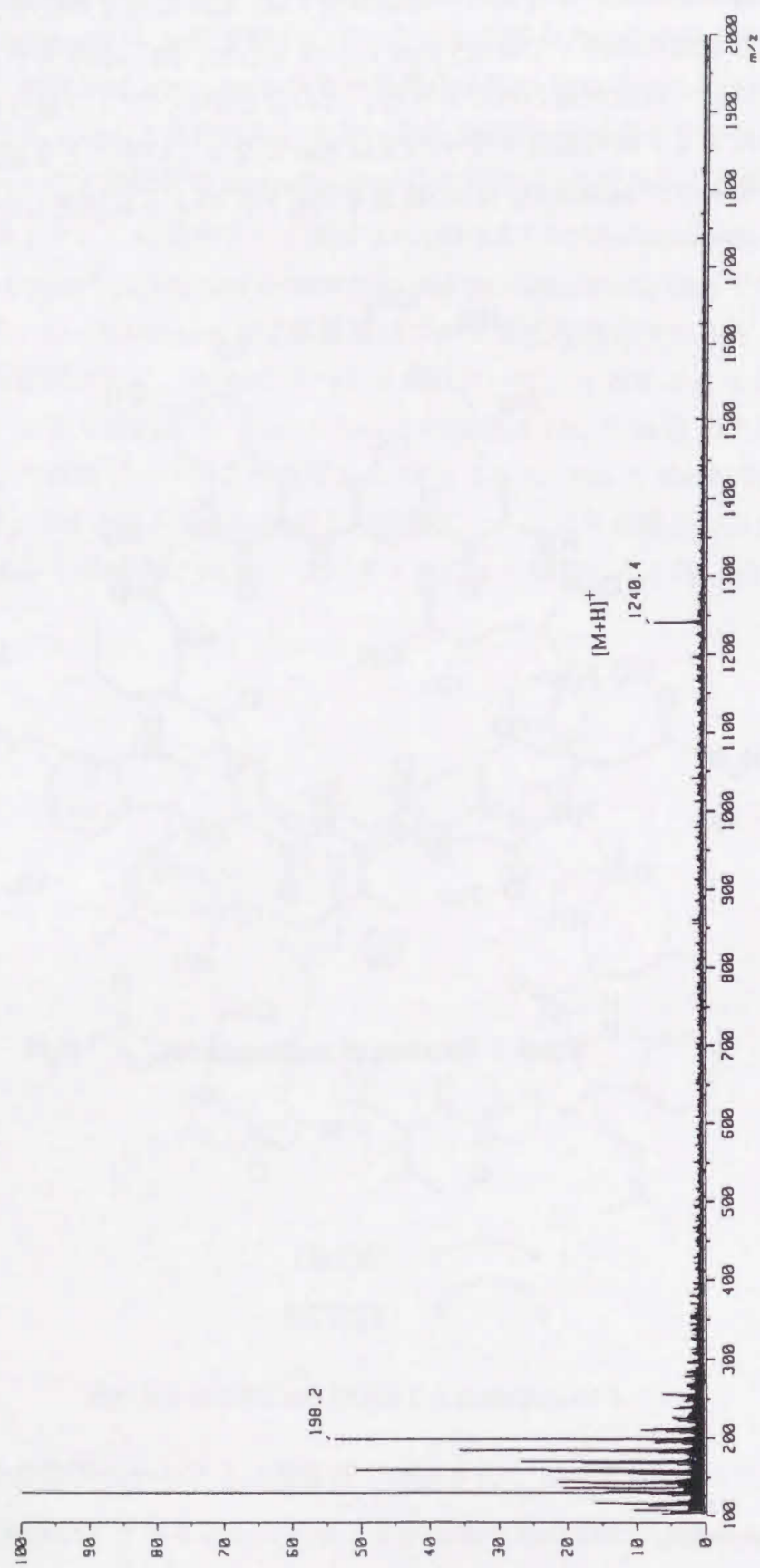


Fig. 3-4. Positive FAB/MS spectrum of 4 using glycerol as a matrix.

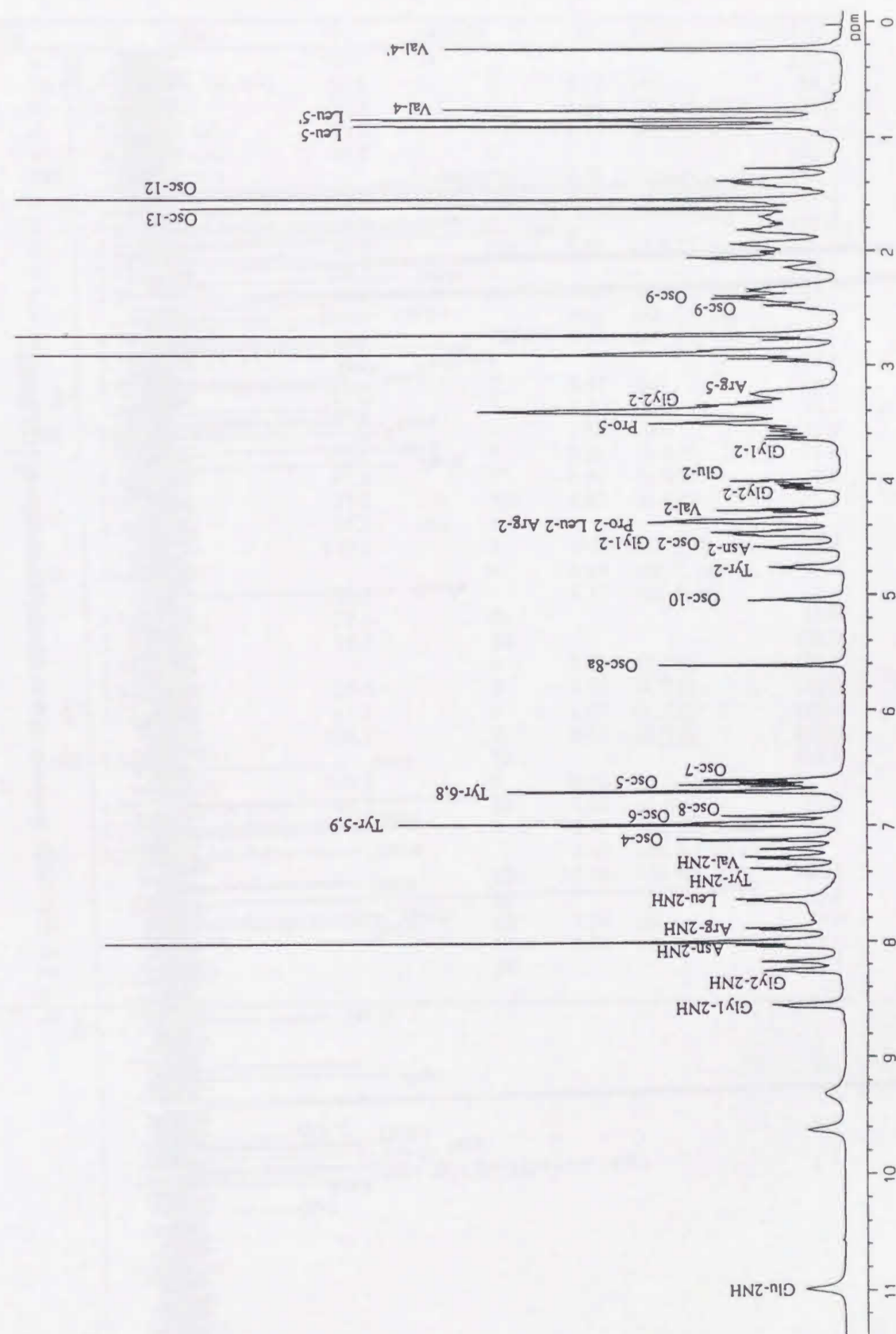


Fig. 3-5.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of 4 in dimethylformamide- $d_7$  (500 MHz).



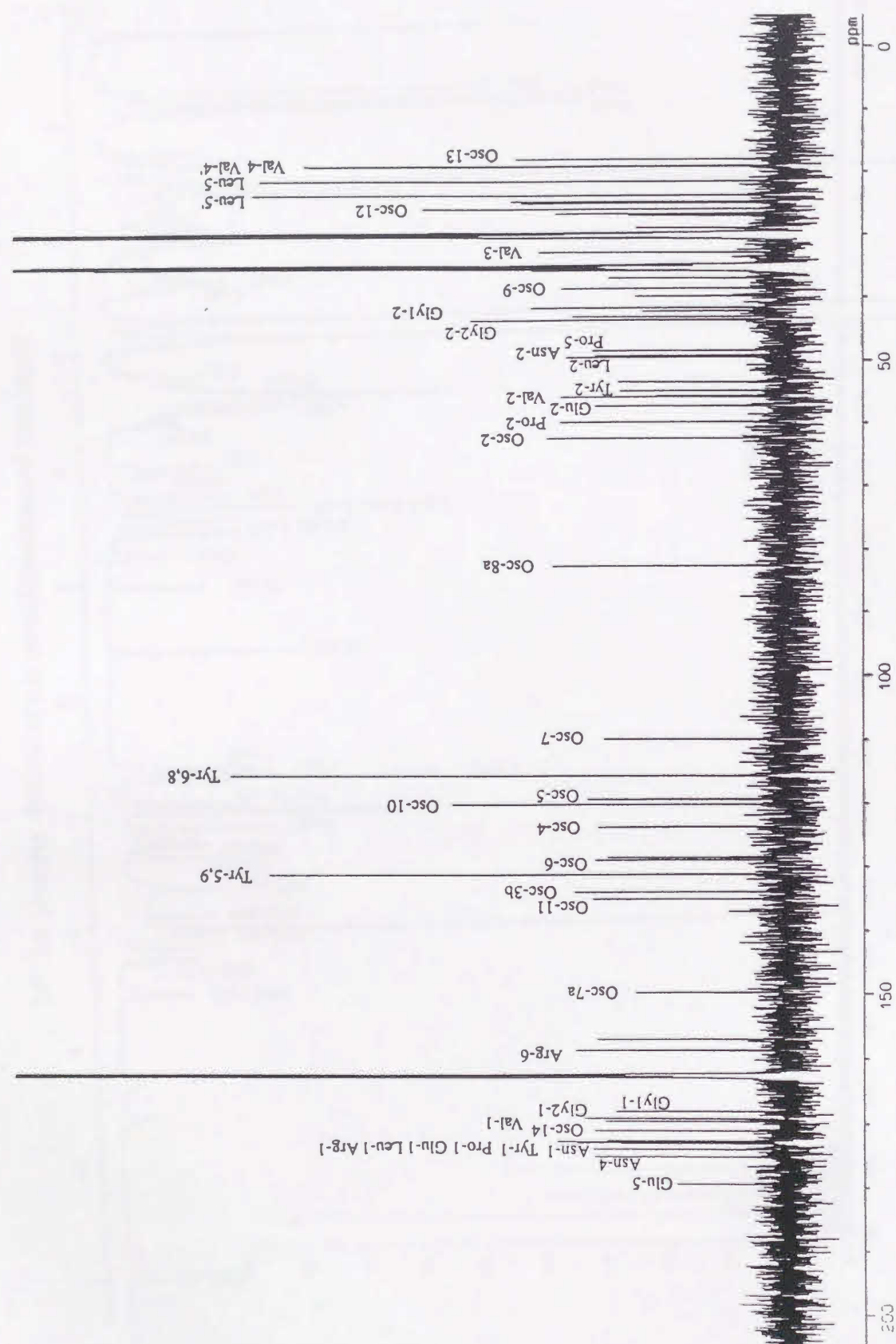


Fig. 3-6.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of 4 in dimethylformamide- $d_7$  (125 MHz).

Table 3-1.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for oscillatorin (4) in dimethylformamide- $d_7$ .

position	$^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$	position	$^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$
Val 1			169.7	Tyr 1			173.2
2	4.27	(dd, 8.9, 9.5)	55.8	2	4.77	(m)	54.8
3	1.4	(m)	32.8	3	2.88	(dd, 4.9, 13.2)	39.7
4	0.78	(d, 6.4)	19.0		2.75	(dd, 8.0, 13.2)	
4'	0.24	(d, 6.4)	19.2	4			128.5
NH	7.28	(d, 9.5)		5,9	7.00	(d, 8.2)	131.2
Pro 1			173.0	6,8	6.71	(d, 8.2)	115.6
2	4.38	(dd, 3.5, 5.2)	59.8	7			157.0
3	2.0	(m)	30.2	NH	7.38	(d, 9.2)	
4	1.82	(m)	24.7	Gly 1 1			168.1
5	3.51	(m)	48.3	2	4.45	(dd, 7.2, 17)	42.1
Asn 1			174.0		3.64	(dd, 4.9, 17)	
2	4.59	(m)	49.1	NH	8.56	(dd, 4.9, 7.2)	
3	3.57	(dd, 4.5, 17)	36.8	Leu 1			172.6
	2.95	(dd, 4.1, 17)		2	4.37	(m)	49.4
4			175.2	3	1.4	(m)	43.5
NH	8.05	(d, 8.9)		4	1.57	(m)	25.0
Glu 1			172.8	5	0.92	(d, 6.4)	21.5
2	4.02	(m)	57.2	5'	0.86	(d, 6.7)	23.8
3	2.07	(m)	27.0	NH	7.65	(d, 8.6)	
4	2.35	(m)	34.5	Osc 1			
5			179.5	2	4.48	(dd, 2, 7)	62.4
NH	10.99	(bs)		3	2.89	(dd, 7, 14)	43.0
Arg 1			172.8		2.41	(dd, 2, 14)	
2	4.35	(m)	53.4	3a			55.6
3	2.15	(m)	28.9	3b			134.0
	1.96	(m)		4	7.13	(d, 7.6)	123.7
4	1.7	(m)	26.6	5	6.65	(t, 7.6)	119.3
5	3.25	(m)	41.5	6	6.99	(t, 7.6)	128.9
7			158.7	7	6.61	(d, 7.6)	109.9
2-NH	7.90	(d, 9.1)		7a			149.8
Gly 2 1			169.2	8	6.92	(d, 3.4)	
2	4.07	(dd, 7.5, 17.0)	43.5	8a	5.62	(d, 3.4)	82.6
	3.33	(dd, 4.3, 17.0)		9	2.49	(dd, 7.9, 14.4)	38.4
NH	8.26	(dd, 4.3, 7.5)			2.42	(dd, 6.1, 14.4)	
				10	5.05	(dd, 6.1, 7.9)	120.1
				11			135.1
				12	1.56	(s)	25.9
				13	1.64	(s)	18.0
				14			171.1

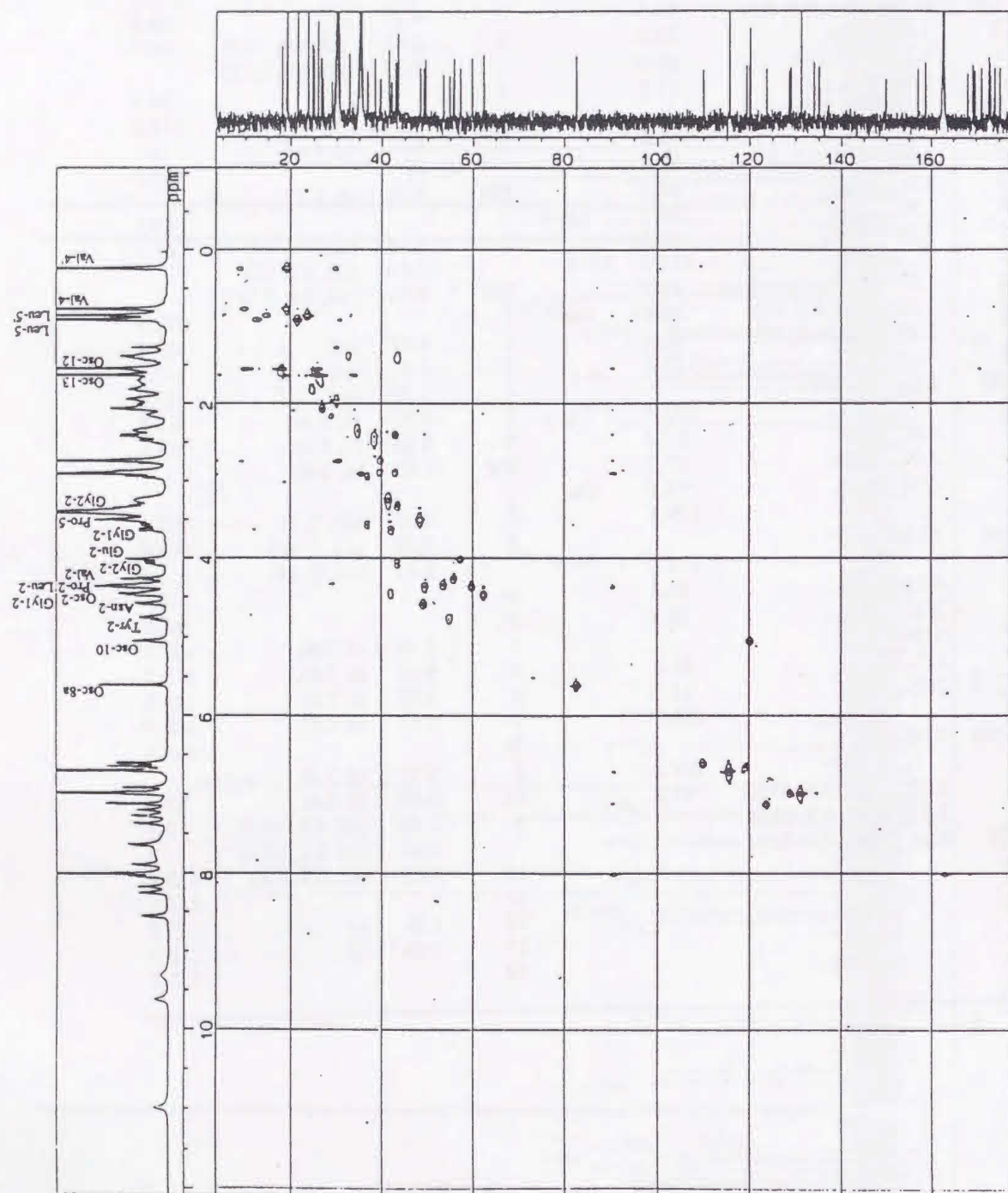


Fig. 3-7.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spectrum of **4** in dimethylformamide- $d_7$ .

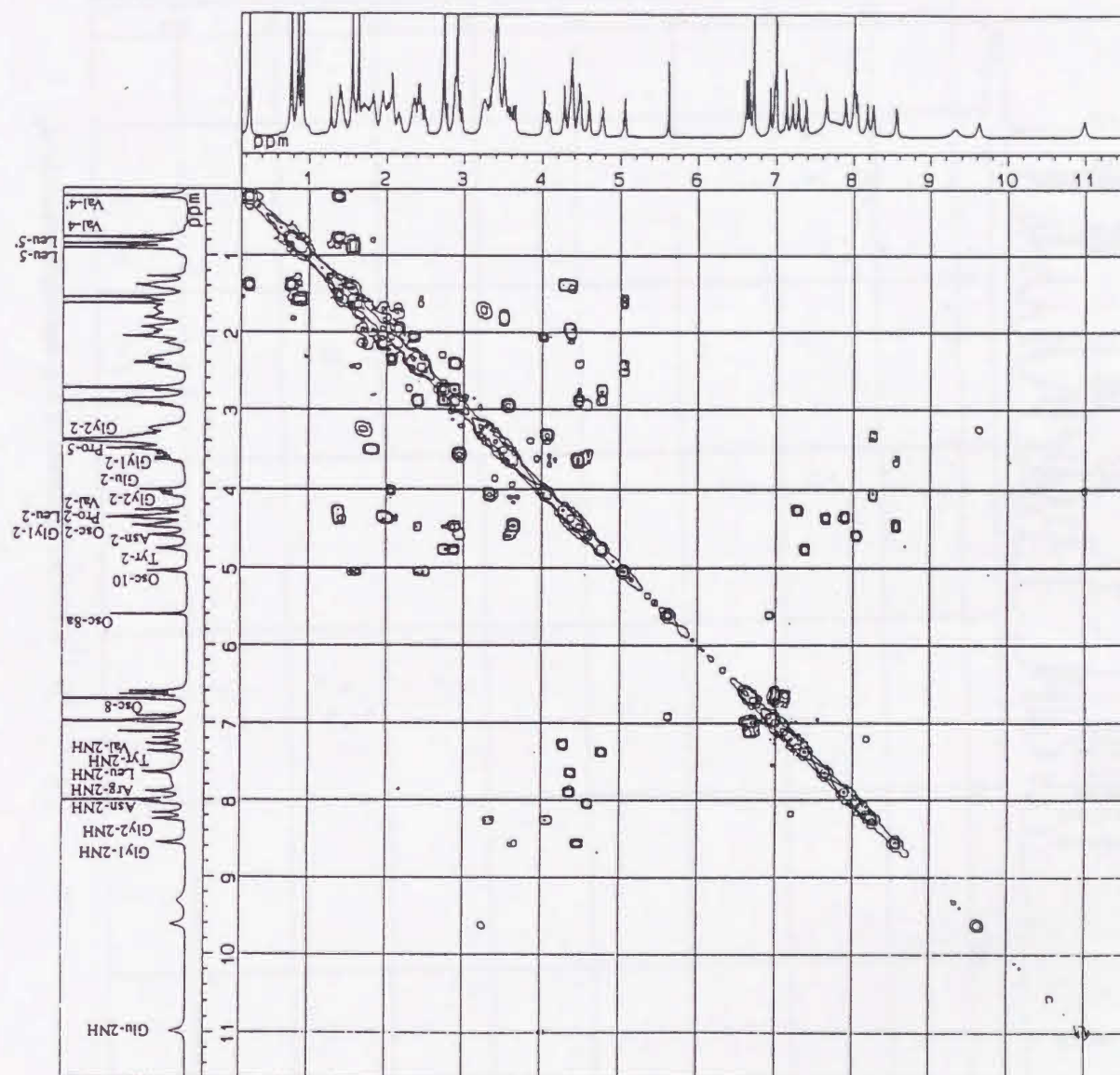


Fig. 3-8.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum of **4** in dimethylformamide- $d_7$ .



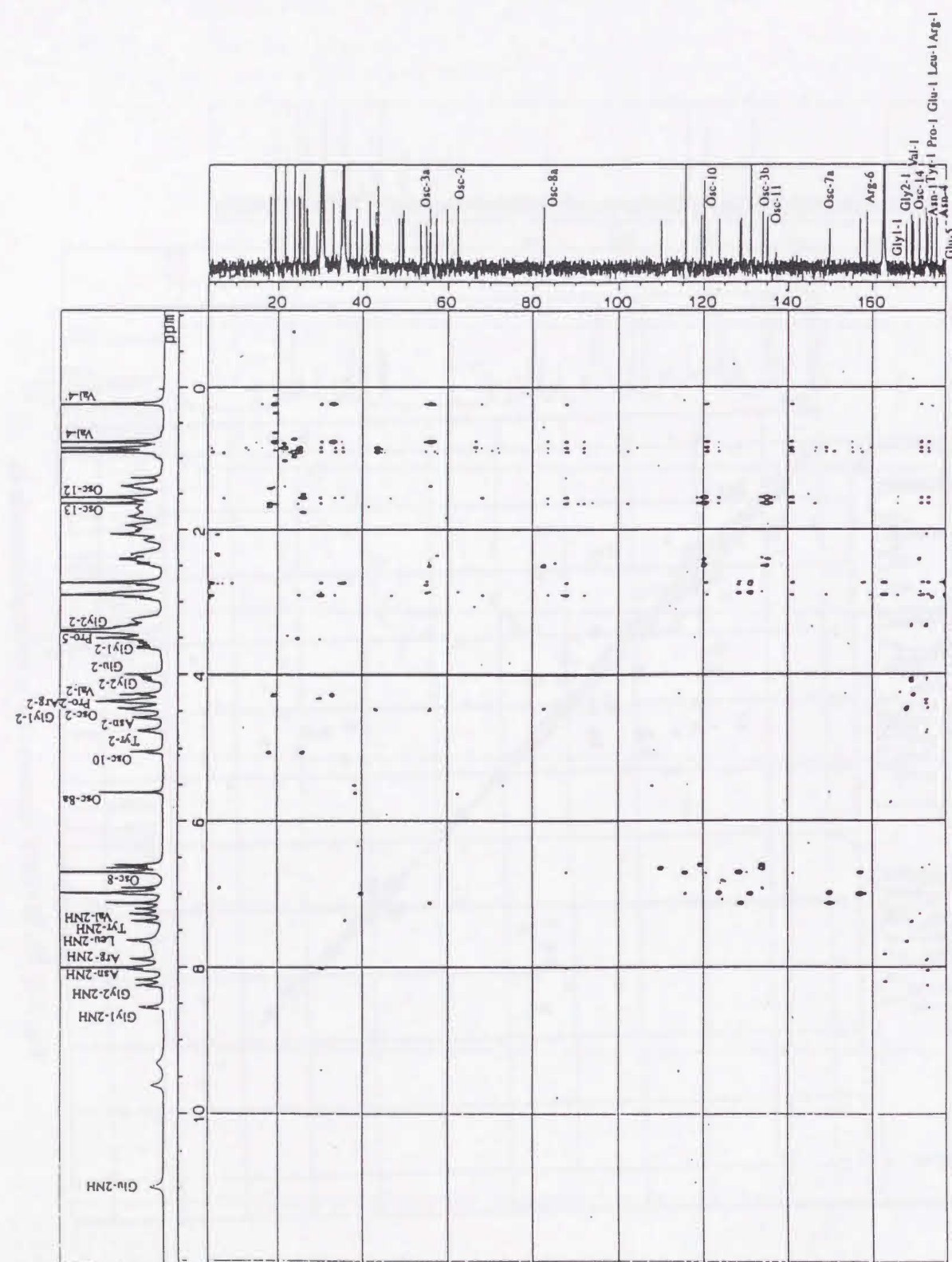


Fig. 3-9.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spectrum of 4 in dimethylformamide- $d_7$ .

### 第3節 Oscillatorin の生理活性

Oscillatorin はキモトリプシンの活性を強力に阻害し、その  $\text{IC}_{50}$  は  $8 \times 10^{-7} \text{ M}$  であった。しかし、トリプシンの活性は  $2 \times 10^{-5} \text{ M}$  でもほとんど阻害しなかった。



#### 第4節 考察

Oscillatoric acid ユニットは、トリプトファンの分子内環化反応とそれに伴うイソプレニユニットとの付加反応により生合成されるものと考えられる。Oscillatoric acid と類似した骨格を持つ化合物が海洋のヒラムシ *Flustra foliacea* から単離されている<sup>35)</sup>。Flustramine A および B と命名された化合物は、hexahydro-3a-(3-methyl-2-butenyl)-pyrrolo[2,3-b]indole 骨格を持ち oscillatoric acid の基本骨格と非常に良く似ている。ヒラムシの体内には藍藻類が共生していることが知られており、flustramine 類も共生藍藻類により産生されている可能性が考えられている。最近になって、Murakami ら<sup>36)</sup>により藍藻 *Microcystis aeruginosa* から oscillatoric acid ユニットを持つ環状ペプチド kawaguchipectin が報告されたことから、oscillatoric acid は藍藻類に広く存在していることが考えられる。

#### 第4章 3-Amino-6-hydroxy-2-piperidone (Ahp) を含む新規環状ペプチド Oscillapeptin A~C、および G

##### 第1節 Oscillapeptin 類の単離

##### (1) Oscillapeptin A および G の単離

*Oscillatoria agardhii* (NIES-610 = CCAP 1459/22 = NIVA CYA 18) を CT 培地中で通気培養を行った。1120 L の培養液から藻体を集めた後、凍結乾燥を行い、乾燥藻体 99.1 g を得た。この試料に 8 L の  $\text{CHCl}_3$ : $\text{MeOH}$ : $\text{H}_2\text{O}$  = 1:3:1 を加えて可溶性成分を抽出した。抽出液を減圧乾固し、5% 酢酸水溶液に懸濁させた。不溶物を遠心分離で除いた後、Sep Pak ODS カートリッジに吸着させ、20%  $\text{MeOH}$  で洗浄した。90%  $\text{MeOH}$  で溶出されてきた画分を減圧乾固した後、溶出物を 20%  $\text{MeOH}$  に溶解した。この分画を逆相 HPLC (Ultron ODS, 20 x 250 mm; 55%  $\text{MeOH}$ 、50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) で精製することにより oscillapeptin G (5、240.2 mg、乾燥重量の 0.2%) および oscillapeptin A (6、15.7 mg、乾燥重量の 0.02%) をそれぞれ単離した。

##### (2) Oscillapeptin B の単離

CT 培地を用いて *Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/14) の通気培養を行い、80 L の培地から乾燥藻体 7.7 g を得た。得られた乾燥藻体を 400 mL の  $\text{MeOH}$  に懸濁した後、遠心分離により抽出液を得た。抽出液を減圧濃縮後、5% 酢酸水溶液に抽出物を懸濁し、遠心分離により不溶物を除いた。遠心上清を Sep Pak ODS カートリッジに吸着させた後、20%  $\text{MeOH}$  でカートリッジを洗浄した。90%  $\text{MeOH}$  で溶出後、溶出液を減圧乾固した。20%  $\text{MeOH}$  に溶出物を溶解し、逆相 HPLC (Mightysil ODS, 20 x 250 mm; 65%  $\text{MeOH}$ 、50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) および順相 HPTLC (Silica gel 60 F254、0.25 mm、 $\text{CHCl}_3$ : $\text{MeOH}$ : $\text{H}_2\text{O}$  = 60:40:10) で精製することにより oscillapeptin B (7、16.6 mg、乾燥重量の 0.2%) を単離した。

##### (3) Oscillapeptin C の単離

10 L の培養瓶を用いて *Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/16) を CT 培地中で通気培養を行った。80 L の培養液を行い、凍結乾燥試料 5.5 g を得た。 $\text{MeOH}$  400 mL に乾燥藻体 (5.5 g) を懸濁し、 $\text{MeOH}$  抽出液を得た。抽出液を減圧乾固後、抽出物を 5% 酢酸水溶液に懸濁し、不溶物を遠心分離で除いた。上清を Sep Pak ODS カートリッジに吸着させた後、20%  $\text{MeOH}$  で洗浄し、90%  $\text{MeOH}$  で溶出した。90%  $\text{MeOH}$  溶出画分を減圧乾固後、溶出物を 20%  $\text{MeOH}$  に溶解し逆相 HPLC (Mightysil ODS, 20 x 250 mm; 65%  $\text{MeOH}$ 、50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) および順相 HPTLC (Silica gel 60 F254、0.25 mm、 $\text{CHCl}_3$ : $\text{MeOH}$ : $\text{H}_2\text{O}$  = 60:40:10) で精製を行い、oscillapeptin C (8、15.3 mg、乾燥重量の 0.3%) を単離した。



## 第2節 Oscillapeptin G の構造解析

Oscillapeptin G (5) は 279 nm に UV 極大吸収を示す無色の固体で、正イオンモードの FABMS スペクトル (Fig. 4-4.) では、 $m/z$  1134 に疑似分子イオンピークが観察された。しかし、負イオンモードの FABMS スペクトル (Fig. 4-5.) では、疑似分子イオンピークが  $m/z$  1110 に観察されたことから、正イオンモードの FABMS スペクトルで観察された  $m/z$  1134 のピークは、 $\text{Na}^+$  が付加したイオンであることが示唆された。5 の分子式は、高分解能 FABMS スペクトル ( $m/z$  1134.5332,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) の結果から、 $\text{C}_{53}\text{H}_{77}\text{O}_{17}\text{N}_9$  (calcd for  $\text{C}_{53}\text{H}_{77}\text{O}_{17}\text{N}_9\text{Na}$ : 1134.5335,  $\Delta$  -0.3 mmu) と決定した。

$^1\text{H}$ - および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルデータ (Table 4-1.) から、5 はペプチド性の化合物であることが示唆され、ニンヒドリン試薬には陰性であったことから、環状ペプチドであるか、N 末端が修飾されていることが示唆された。5 を酸加水分解後 (6 M HCl, 110 °C, 20 hr)、アミノ酸組成を分析したところ、*N*-methyltyrosine (*N*-Me-Tyr), leucine (Leu), homotyrosine (Hty), glutamic acid (Glu), threonine (Thr) および isoleucine (Ile) が確認された。また、Marfey 法および chiral な GC カラムを用いてアミノ酸の立体配置を分析したところ、これらのアミノ酸は全て L 型であることを確認した。

5 の  $^1\text{H}$ -NMR (Fig. 4-6.) において、一般的なアミノ酸残基の他に、5.37 ppm に broad singlet が観察された。この水素がついている炭素は 76.5 ppm に観察され、2 個のヘテロ原子で置換されていることが示唆された。その  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトル (Fig. 4-9.) から、5.37 ppm の broad singlet から 3 位の NH までのつながりが確認された。更に、HMBC スペクトル (Fig. 4-10.) からは、2 位のカルボニル炭素 (170.5 ppm) と 3 位および 6 位の水素との間に相関ピークが観察されたことから、3-amino-6-hydroxy-2-piperidone (Ahp) 残基の存在が明らかとなった (Fig. 4-1.)。Ahp の立体構造については、現在検討中である。

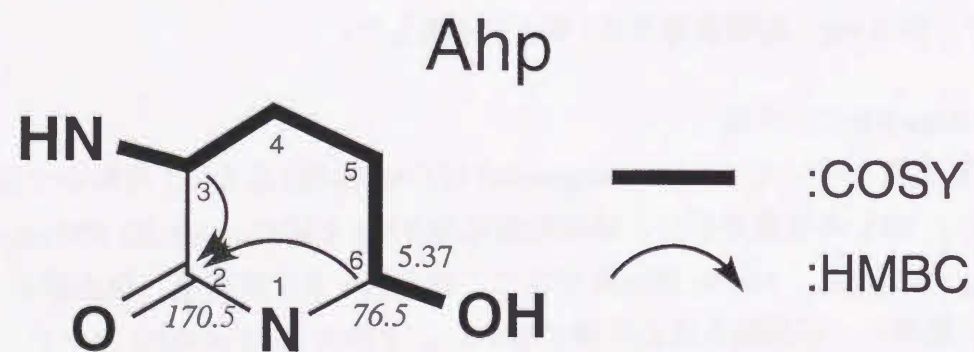


Fig. 4-1. COSY and HMBC correlations of Ahp residue.

さらに、 $^1\text{H}$ -NMR において、4.13 ppm に double doublet のメチン水素が観察され、この水素と結合している geminal のメチレン水素が 3.78 および 3.73 ppm に観察された。これらの水素は HMBC スペクトルにおいて、173.2 ppm のカルボニル炭素と相

関ピークが観察されたことから 5 の残りのユニットとして、glyceric acid を含んでいることが示唆された。アミノ酸と同様にして chiral な GC カラムを用いた分析を行ったところ、この glyceric acid は D 型であることが確認された。Thr-1 では、Thr-1 の 3 位の水素が 5.70 ppm に観察されたことから、Thr-1 の 3 位水酸基はエステルとなっていることが示唆された。また、その分子式から、アミノ酸分析で検出された Glu は、5 では glutamine (Gln) となっていることを確認した。

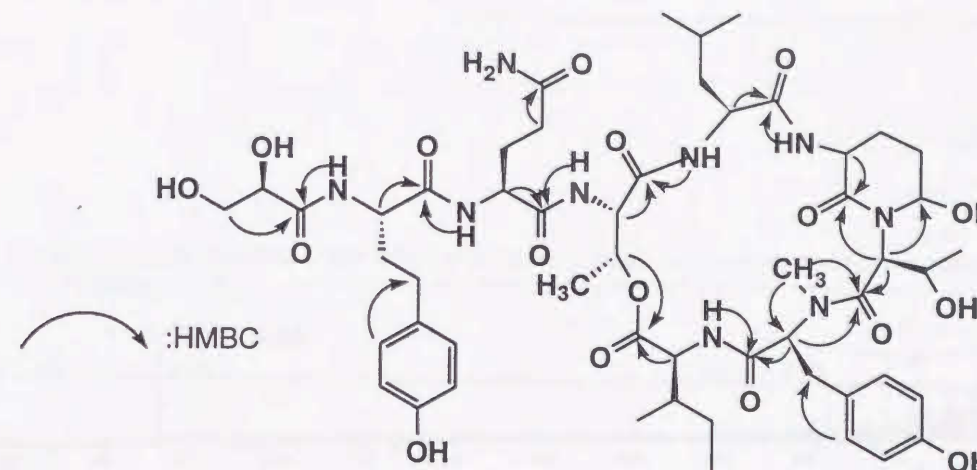


Fig. 4-2. HMBC correlations of 5.

5 のアミノ酸の配列は主に、アミドの NH からカルボニル炭素への HMBC スペクトルにより決定した (Fig. 4-2.)。N-Me-Tyr と Thr-2 との結合は、N-Me-Tyr のメチル基の水素と Thr-2 のカルボニル炭素との間の相関ピークにより確認した。Thr-2 と Ahp との結合は、Thr-2 の 2 位の水素と Ahp の 2 位及び 6 位の炭素との間の相関ピークにより確認した。また、Thr-1 と Ile とのエステル結合は、Thr-1 の 3 位のプロトンから Ile のカルボニル炭素への相関ピークにより確認した。

以上の結果より、oscillapeptin G (5) の構造を Fig. 4-3. のように決定した<sup>37)</sup>。

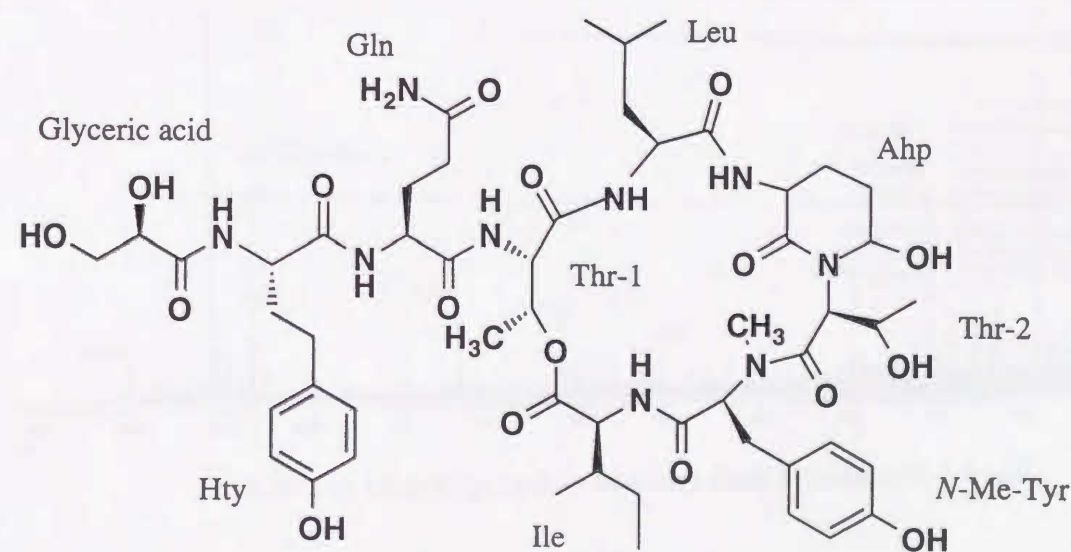


Fig. 4-3. Structure of oscillapeptin G (5).



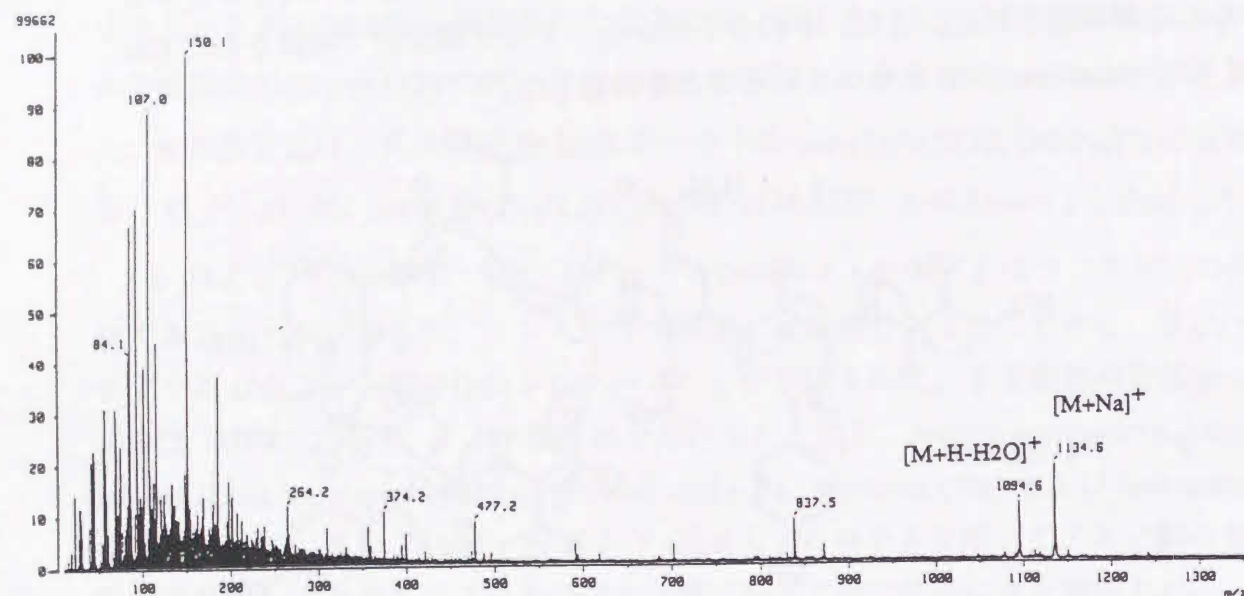


Fig. 4-4. Positive FABMS spectrum of 5 using glycerol as a matrix.

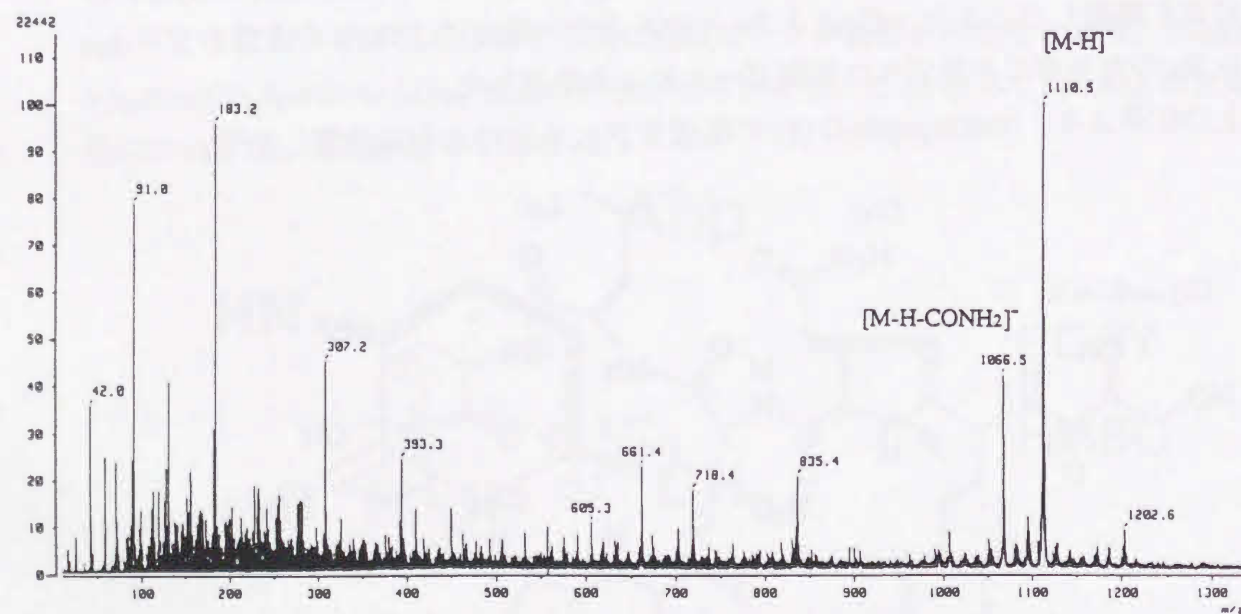


Fig. 4-5. Negative FABMS spectrum of 5 using glycerol as a matrix.

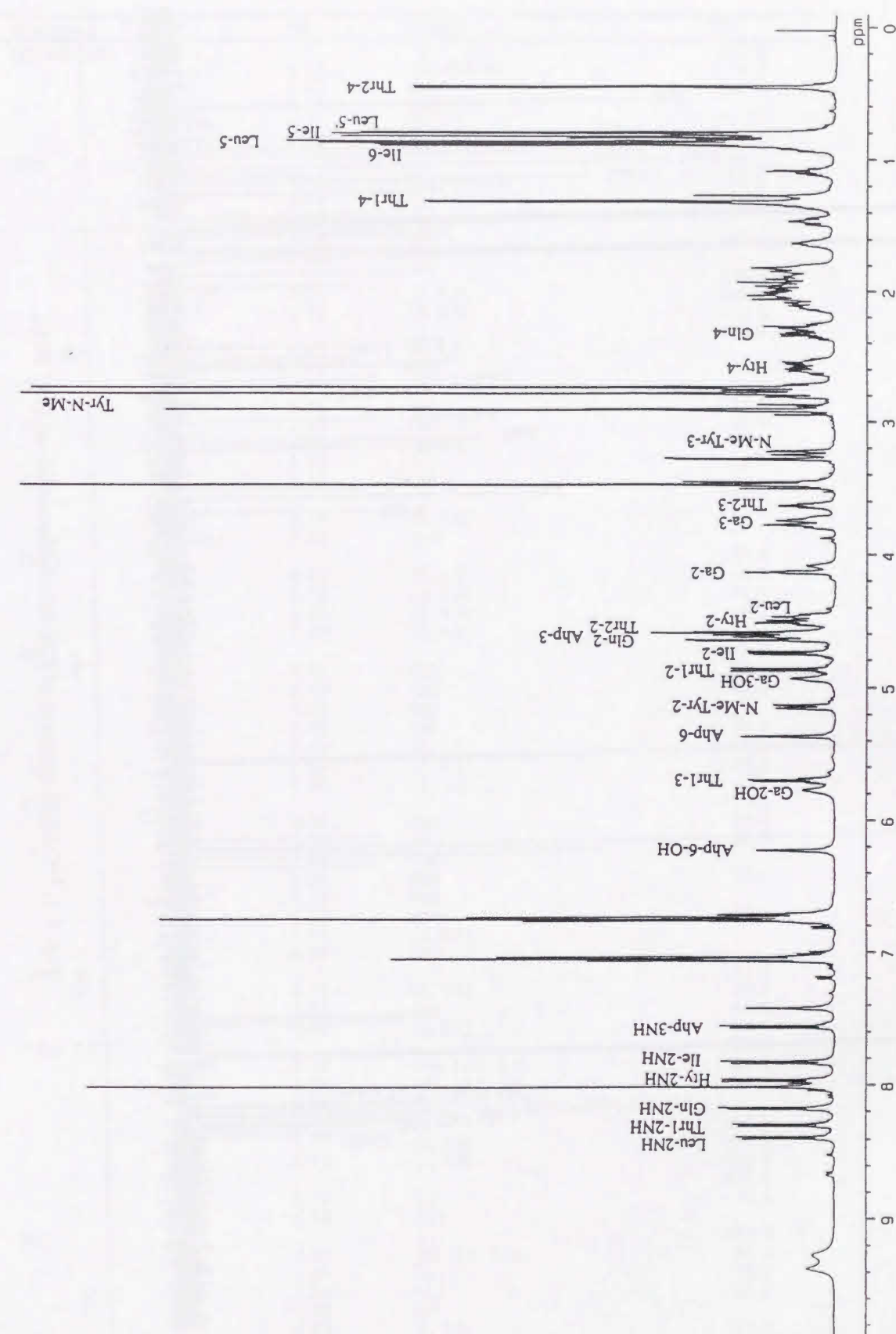


Fig. 4-6.  $^1H$ -NMR spectrum of 5 in dimethylformamide- $d_7$  (500 MHz).



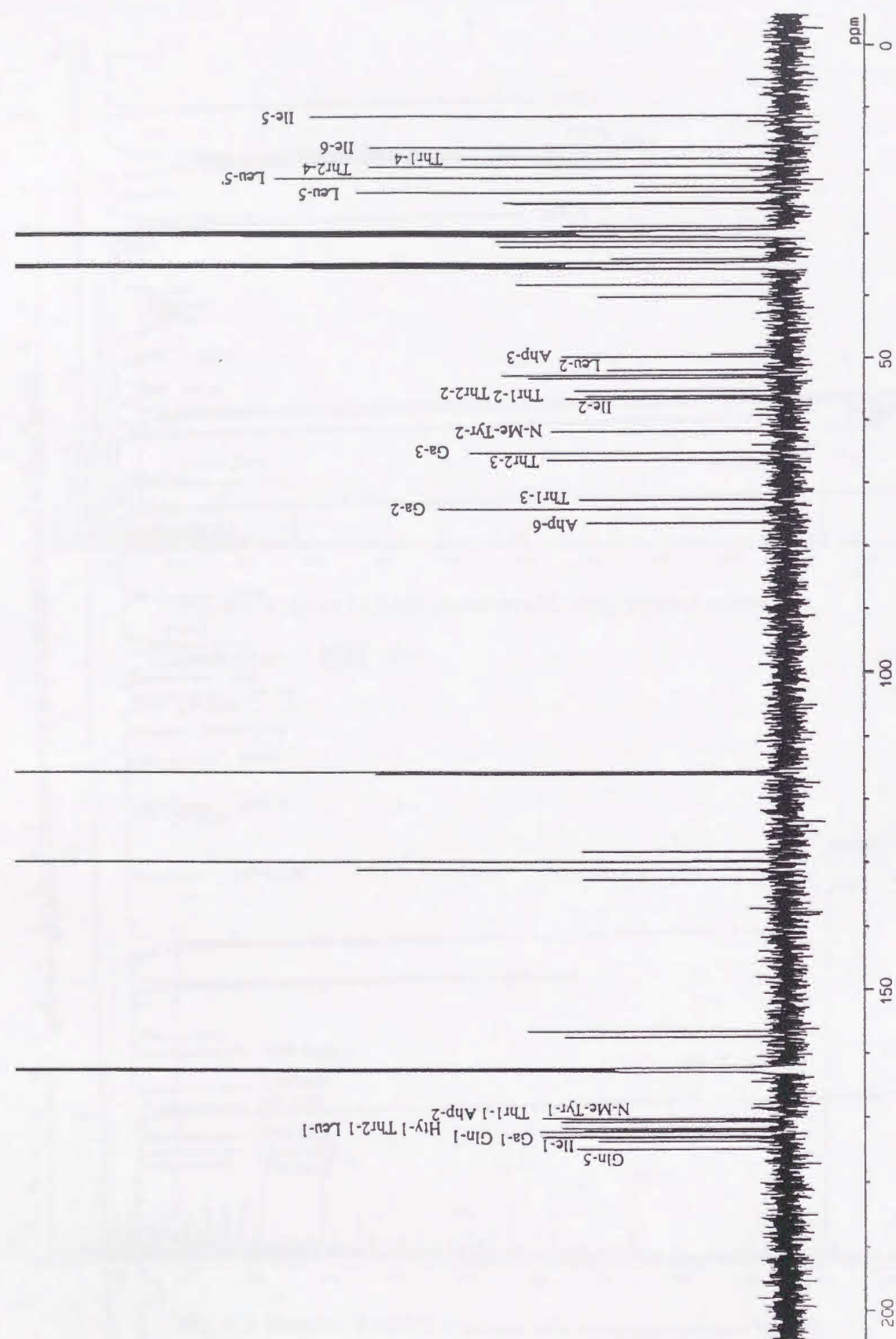


Fig. 4-7.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of 5 in dimethylformamide- $d_7$  (125 MHz).

Table 4-1.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for oscillapeptin G in dimethylformamide- $d_7$ .

Position	$^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$
Glyc-1	1		173.2
	2	4.13	74.3
	3	3.78	65.3
	2-OH	3.73	
	3-OH	5.77	
Hty	1	4.93	
	2		172.1
	3	4.52	52.9
	4	2.12	34.2
	5	1.98	
	6	2.61	30.4
	7	2.54	
	8		128.4
	9	7.05	130.0
	10	6.76	116.2
Gln	NH	7.97	156.6
	1	7.43	
	2		173.0
	3	4.61	53.4
	4	2.03	28.9
Thr-1	5	1.96	
	6	2.35	32.2
	7	2.27	
	8		175.0
	9	8.18	
Leu	10	9.30	
	1		170.5
	2	4.87	56.3
	3	5.70	72.8
	4	1.33	18.3
Ahp	NH	8.30	
	1		173.7
	2	4.47	52.1
	3	1.93	40.2
	4	1.46	
Thr-2	5	1.63	25.3
	6	0.88	21.3
	7	0.80	23.6
	8	8.39	
	9		170.5
N-Me-Tyr	10	4.60	50.0
	1	2.75	22.7
	2	1.82	
	3	2.06	28.9
	4	1.83	
Thr-3	5	5.37	76.5
	6	7.57	
	7	6.23	
	8		172.3
	9	4.59	55.4
Ile	10	3.63	66.5
	1	0.46	19.5
	2		170.4
	3	5.15	61.9
	4	3.24	34.1
Gln-1	5	2.78	
	6		132.8
	7	7.07	131.2
	8	6.75	115.8
	9		157.5
Ile-1	10	2.79	30.4
	1	6.72	
	2		173.7
	3	4.75	56.7
	4	1.89	38.3
Gln-2	5	1.34	25.5
	6	1.09	
	7	0.83	11.5
	8	0.90	16.5
	9	7.83	

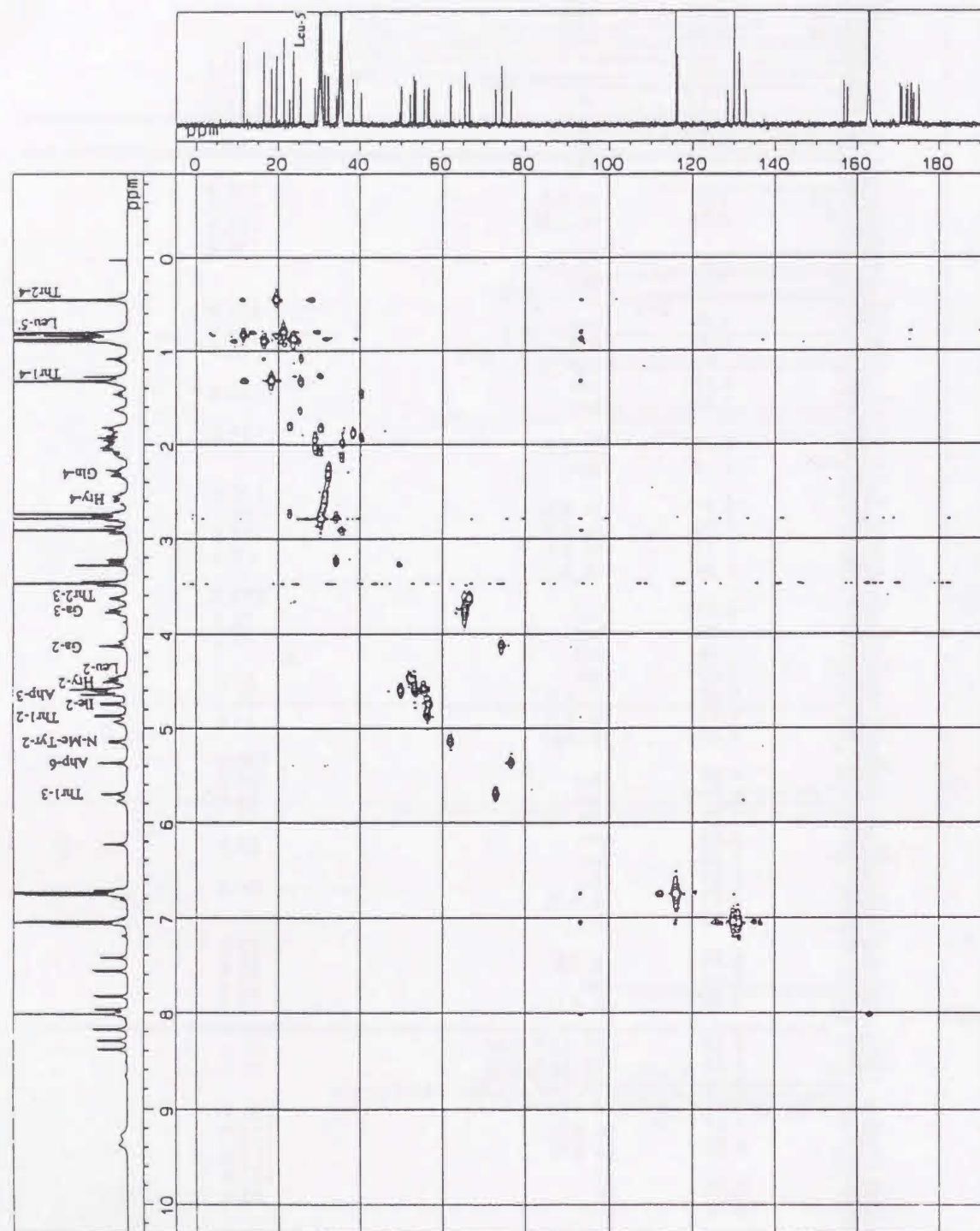


Fig. 4-8.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spectrum of **5** in dimethylformamide- $d_7$ .

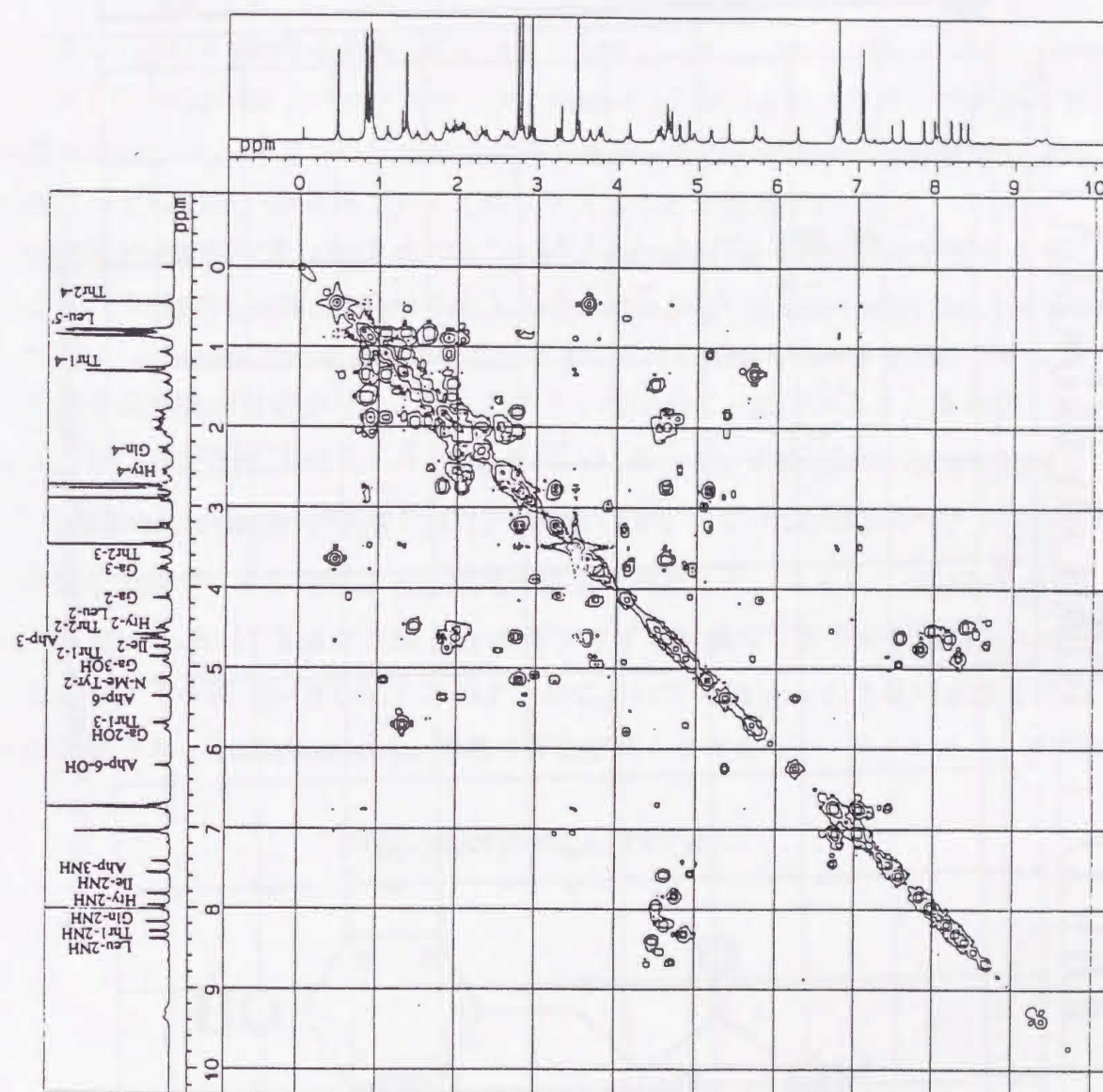


Fig. 4-9.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum of **5** in dimethylformamide- $d_7$ .



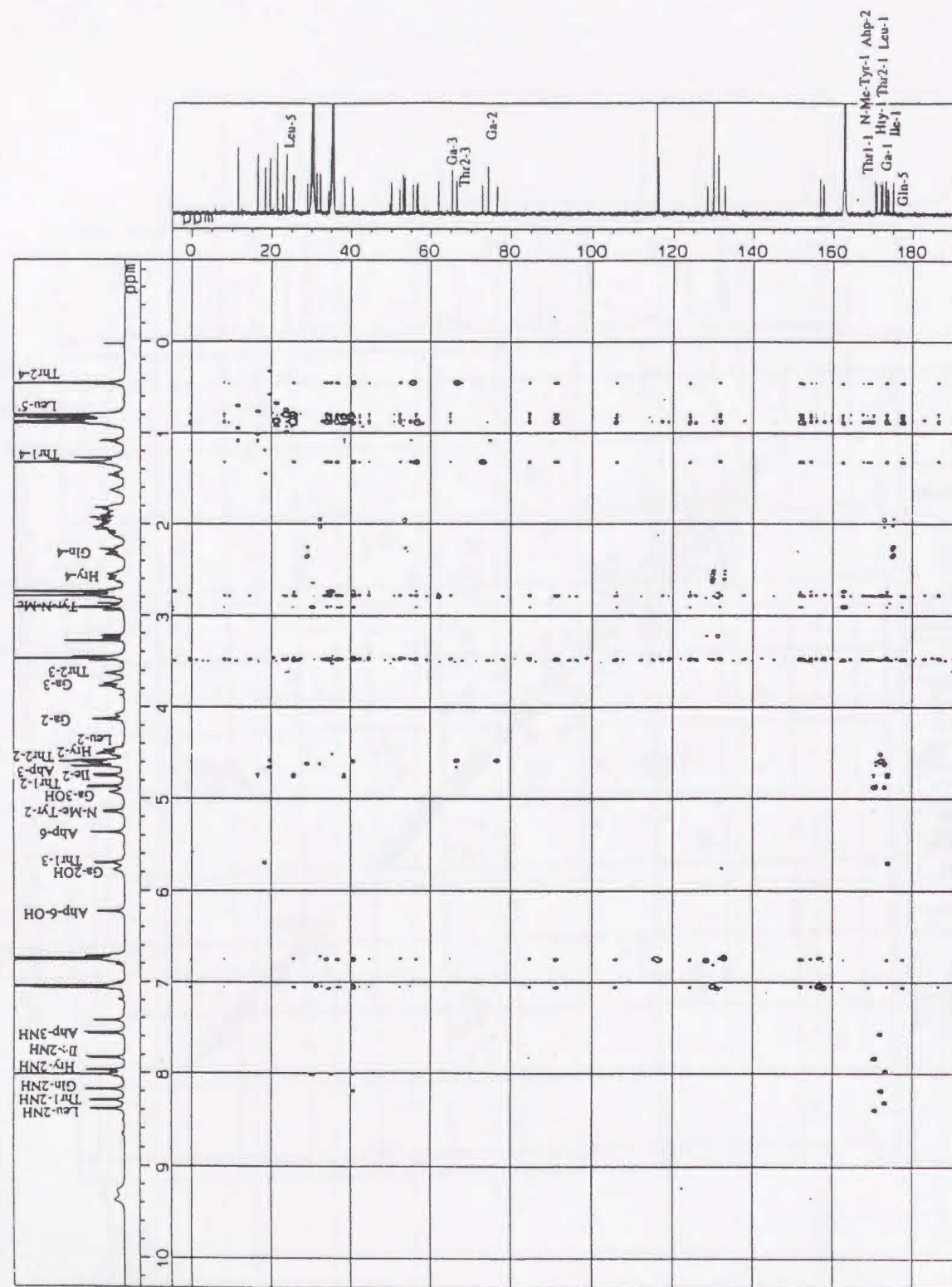


Fig. 4-10.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spectrum of **5** in dimethylformamide- $d_7$ .

### 第3節 Oscillapeptin A~C の構造解析

#### (1) Oscillapeptin A の構造解析

Oscillapeptin A (**6**) は無色の固体で、278 nm に UV 極大吸収を示した。FABMS スペクトルにおいて正イオンモードでは、疑似分子イオンピークが  $m/z$  1166 に観察された。また、 $m/z$  1148 および 1130 に疑似分子イオンピークから  $\text{H}_2\text{O}$  がそれぞれ 1 分子および 2 分子脱水したピークが観察された。高分解能 FABMS スペクトル ( $m/z$  1166.5737,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) の結果から、分子式は  $\text{C}_{56}\text{H}_{79}\text{O}_{18}\text{N}_9$  (calcd for  $\text{C}_{56}\text{H}_{80}\text{O}_{18}\text{N}_9$ : 1166.5621,  $\Delta +11.6$  mmu) と決定した。

$^1\text{H}$ - および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルデータ (Table 4-2.) から **6** はペプチドであることが示唆された。ニンヒドリン試薬では発色しなかったことから、**5** と同様に N 末端が修飾されているか、環状ペプチドとなっていることが示唆された。

**6** を酸加水分解後 ( $6 \text{ M HCl}$ ,  $110^\circ\text{C}$ , 20 hr)、GC/MS により構成アミノ酸を分析したところ、*N*-methyltyrosine (*N*-Me-Tyr), homotyrosine (Hty), glutamic acid (Glu), threonine (Thr) および isoleucine (Ile) が確認された。また、HPLC および chiral な GC カラムを用いた光学異性体の分析から、これらのアミノ酸は全て L 型であることを確認した。

**6** は、その  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル (Fig. 4-13.) において、5.30 ppm に oscillapeptin G (**5**) と同様に broad singlet が観察された。 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルを詳細に検討した結果、**5** と同様に Ahp 残基の存在を確認した。さらに、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルにおいて、5.67 および 5.54 ppm にオレフィン水素のシグナルが観察された。これらのシグナルは  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトルにおいて 4.58 ppm の 2 位の水素までの結合が確認され、tetrahydrotyrosine 残基の存在が明らかとなった (Fig. 4-11.)。また、

tetrahydrotyrosine (ThTyr)

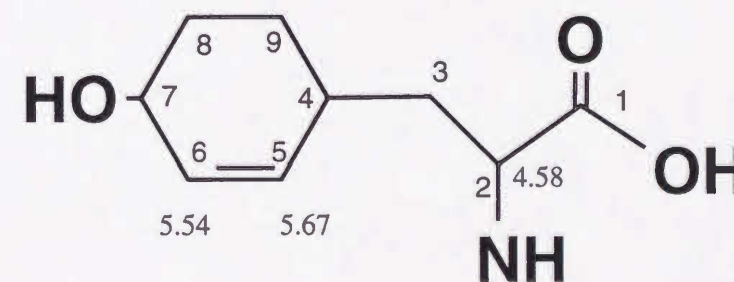


Fig. 4-11. Structure of tetrahydrotyrosine (ThTyr).

oscillapeptin G と同様に D-glyceric acid の存在も確認した。さらに、その分子式からアミノ酸分析で Glu として検出されたアミノ酸は、**6** では glutamine (Gln) となっていることを確認した。



6 のアミノ酸の配列は主に、HMBC スペクトルにより  $\alpha$  位の水素からカルボニル炭素への相関ピークにより決定した。

以上の結果から、oscillapeptin A (6) の構造を Fig. 4-12. のように決定した。

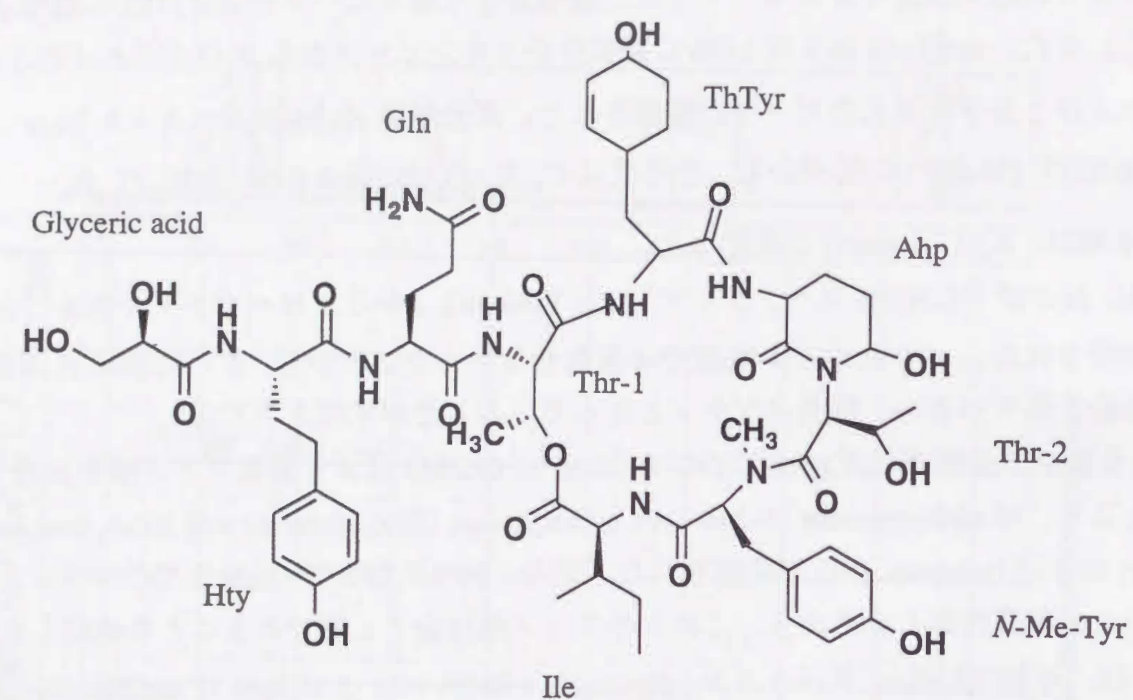


Fig. 4-12. Structure of oscillapeptin A (6).

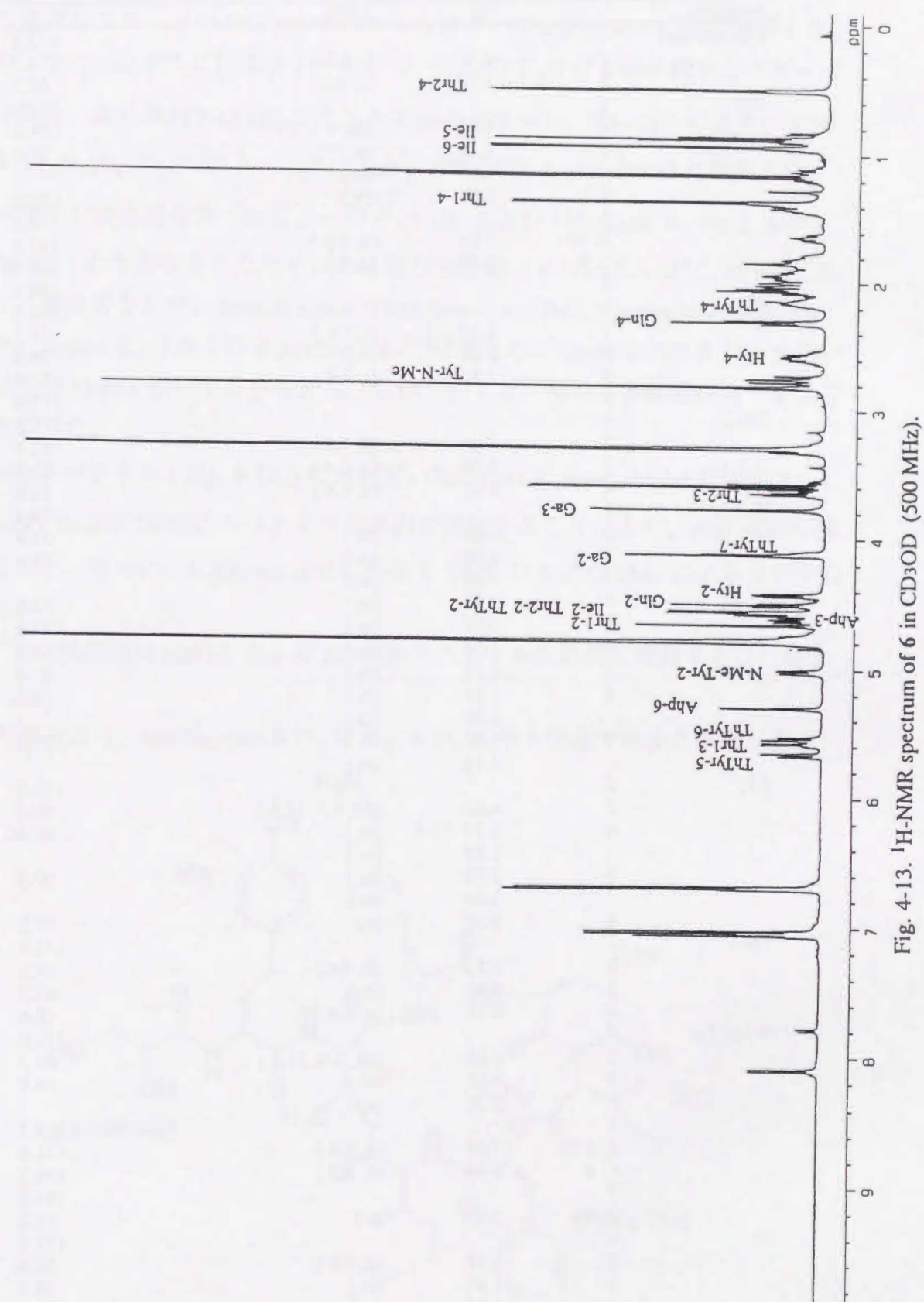


Fig. 4-13.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of 6 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).



Table 4-2.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for oscillapeptin A in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Position	$^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$
Glyceric acid	1		175.2
	2	4.12 (t, 4.3)	74.3
	3	3.78 (d, 4.3)	65.5
Hty	1		173.9
	2	4.43 (dd, 4.9, 8.9)	54.0
	3	2.16 (m)	35.4
		1.93 (m)	
	4	2.58 (m)	32.1
	5		133.2
	6, 10	7.03 (d, 8.6)	130.5
	7, 9	6.70 (d, 8.6)	116.3
Gln	8		156.7
	1		174.2
	2	4.50 (t, 7.6)	54.1
	3	2.07 (m)	29.0
	4	2.31 (t, 7.5)	32.4
Thr-2	5		177.8
	1		171.8
	2	4.66 (d, 1.2)	57.4
	3	5.58 (q, 6.4)	73.2
ThTyr	4	1.37 (d, 6.4)	18.6
	1		174.4
	2	4.58 (m)	57.9
	3	2.00 (m)	37.6
		1.64 (m)	
	4	2.18 (m)	33.5
	5	5.67 (m)	132.6
	6	5.54 (m)	134.2
	7	4.11 (m)	67.6
	8	1.95 (m)	32.3
Ahp		1.39 (m)	
	9	1.80 (m)	27.0
		1.12 (m)	
	2		171.8
	3	4.62 (dd, 6.7, 12.5)	51.0
	4	2.77 (m)	26.4
		1.85 (m)	
	5	2.02 (m)	30.8
		1.82 (m)	
	6	5.30 (s)	77.3
Thr-1	1		173.4
	2	4.57 (d, 6.4)	54.1
	3	3.65 (m)	67.3
	4	0.51 (d, 6.4)	19.6
N-Me-Tyr	1		172.0
	2	5.02 (dd, 3.0, 11.9)	63.3
	3	3.31 (m)	34.4
		2.76 (m)	
	4		129.1
	5, 9	7.05 (d, 8.5)	131.8
	6, 8	6.69 (d, 8.5)	116.7
Ile	7		157.7
	N-Me	2.82 (s)	31.3
	1		175.3
	2	4.58 (d, 9.5)	52.6
	3	1.92 (m)	38.3
	4	1.43 (m)	26.4
		1.18 (m)	
	5	0.88 (t, 7.7)	10.9
	6	0.95 (d, 7.0)	16.4

## (2) Oscillapeptin Bの構造解析

Oscillapeptin B (7) は無色の固体で、UV スペクトルは 278 nm に極大吸収を示した。7 の正イオンモードの FABMS スペクトルにおいて、 $m/z$  995 に疑似分子イオンピークが、また  $m/z$  977 に疑似分子イオンピークから  $\text{H}_2\text{O}$  が 1 分子脱水したピークが観察された。高分解能 FABMS スペクトル ( $m/z$  995.5425,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) により、7 の分子式を  $\text{C}_{50}\text{H}_{74}\text{O}_{13}\text{N}_8$  (calcd for  $\text{C}_{50}\text{H}_{75}\text{O}_{13}\text{N}_8$ : 995.5453,  $\Delta$  -2.8 mmu) と決定した。

7 はペプチド性の化合物であることがその  $^1\text{H}$ - および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルデータ (Table 4-3.) から示唆されたため、7 を酸加水分解 (6 M HCl, 110 °C, 20 hr) した後、アミノ酸分析をした。homotyrosine (Hty), threonine (Thr), *N*-methylphenylalanine (*N*-Me-Phe), lysine (Lys) および isoleucine (Ile) が確認され、chiral な GC カラムを用いた分析および Marfey 法による分析から、これらのアミノ酸の立体配置は全て L 型であると決定した。

$^1\text{H}$ -NMR スペクトル (Fig. 4-15.) において、5.05 ppm に broad singlet が観察され、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルを詳細に検討することにより、Ahp 残基の存在を確認した。さらに、D-glyceric acid の存在も NMR および GC/MS による分析から確認した。

7 のアミノ酸配列は HMBC および ROESY スペクトルを詳細に検討することにより決定した。

以上の結果から、oscillapeptin B (7) は Fig. 4-14. に示す構造であると決定した。

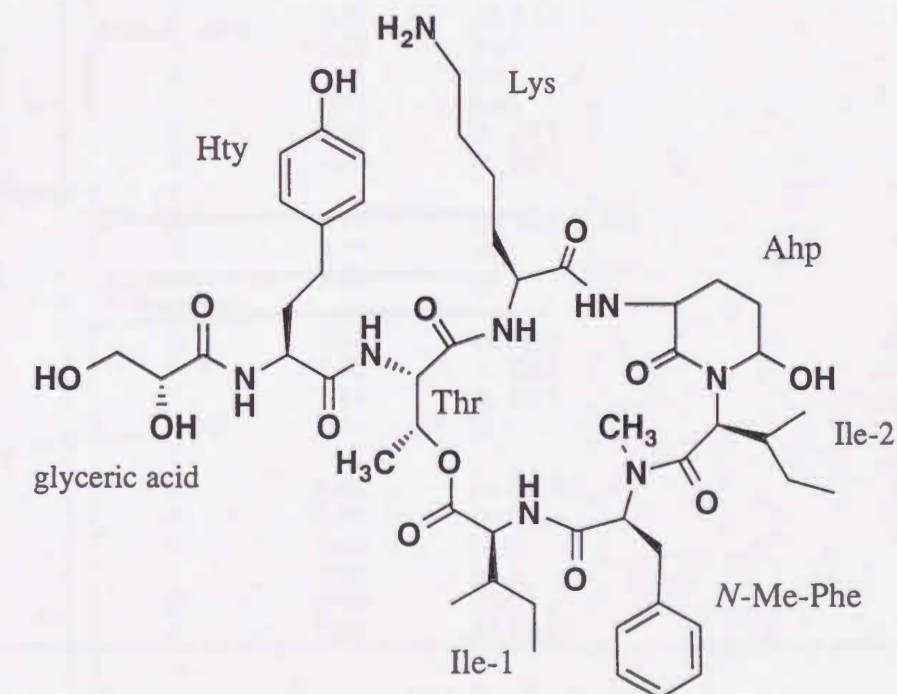


Fig.4-14. Structure of oscillapeptin B (7).



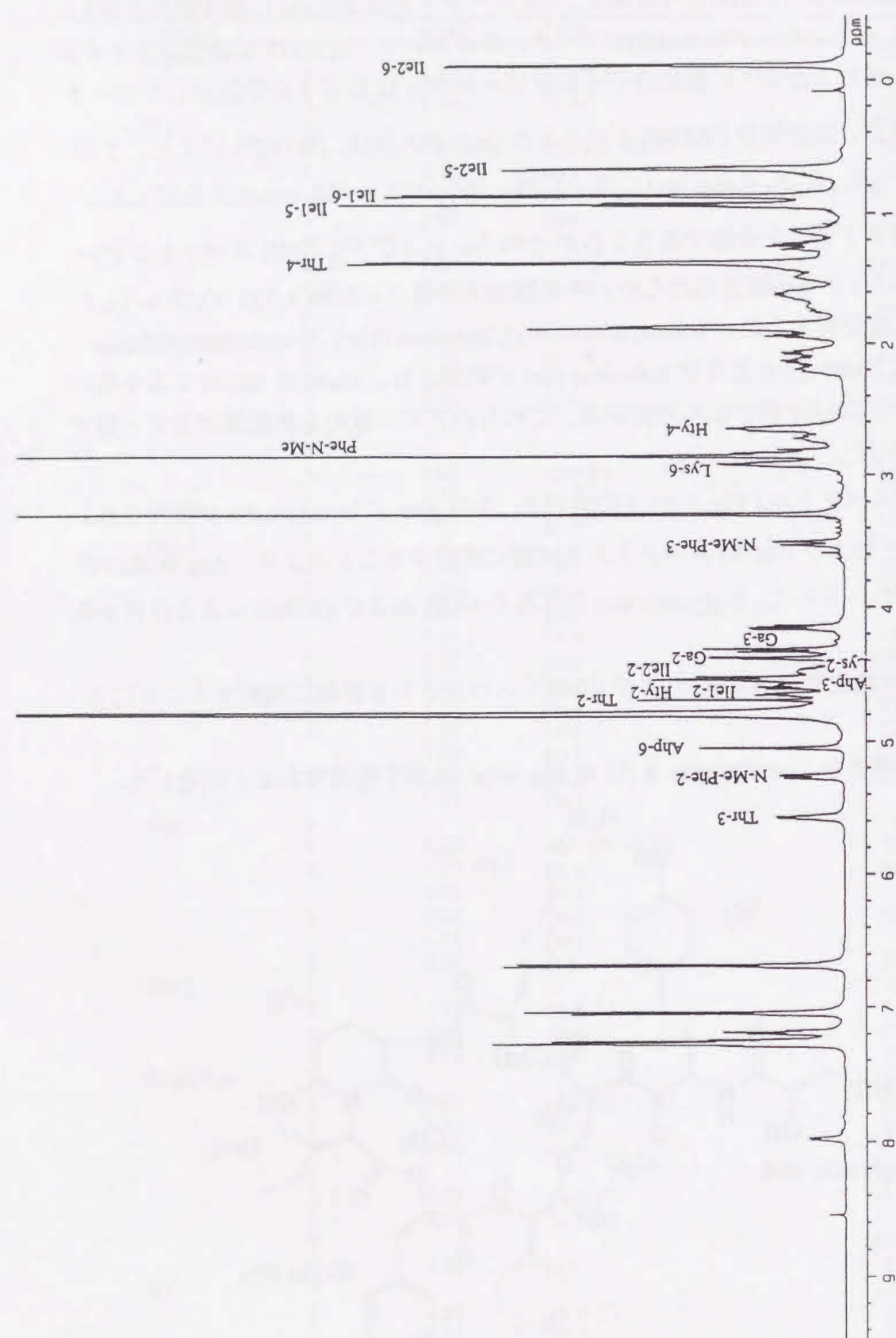


Fig. 4-15.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of 7 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).

Table 4-3.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$  NMR data for oscillapeptin B in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Position		$^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$
Glyceric acid	1			173.1
	2	4.39	(dd, 3.3, 6.0)	72.3
	3	4.33	(dd, 3.3, 10.9)	70.8
		4.15	(dd, 6.0, 10.9)	
Hty	1			175.2
	2	4.54	(m)	54.5
	3	2.14	(m)	35.7
		2.08	(m)	
	4	2.65	(m)	32.0
	5			133.1
	6, 10	7.05	(d, 8.6)	130.5
	7, 9	6.69	(d, 8.6)	116.3
Thr	8			156.7
	1			171.8
	2	4.69	(s)	57.5
	3	5.58	(q, 6.4)	73.3
Lys	4	1.39	(d, 6.7)	18.8
	1			174.1
	2	4.48	(br)	54.5
	3	2.20	(m)	30.2
Ahp		1.71	(m)	
	4	1.49	(m)	23.8
		1.41	(m)	
	5	1.62	(m)	27.6
	6	2.92	(m)	40.9
	2			171.5
	3	4.59	(dd, 6.1, 6.4)	51.1
	4	2.73	(m)	22.4
Ile-2		1.85	(m)	
	5	1.87	(m)	31.3
	6	5.05	(s)	76.2
	1			172.7
	2	4.52	(d, 3.7)	56.7
	3	1.88	(m)	34.6
N-Me-Phe	4	1.14	(m)	25.2
		0.71	(m)	
	5	0.68	(t, 7.0)	10.8
	6	-0.11	(d, 6.5)	15.0
	1			172.3
	2	5.27	(dd, 0.3, 12.0)	63.1
Ile-1	3	3.52	(m)	35.6
		2.84	(m)	
	4			138.9
	5, 9	7.29	(t, 7.0)	130.9
	6, 8	7.26	(t, 7.0)	130.0
	7	7.19	(t, 7.0)	128.1
	N-Me	2.86	(s)	31.7
	1			175.4
	2	4.65	(d, 6.0)	57.6
	3	1.94	(m)	38.0
	4	1.40	(m)	27.4
		1.24	(m)	
	5	0.95	(t, 7.3)	11.5
	6	0.88	(d, 7.0)	15.9



### (3) Oscillapeptin Cの構造解析

Oscillapeptin C (**8**) は無色の固体で、279 nm に UV 極大吸収を示した。正イオンモードの FABMS スペクトルにおいて、 $m/z$  983 に疑似分子イオンピークが観察された。また、疑似分子イオンピークから  $H_2O$  が 1 分子脱水したピークが  $m/z$  966 に観察された。疑似分子イオンピークの高分解能 FABMS スペクトル ( $m/z$  983.4587,  $[M+H]^+$ ) の分析結果より、**8** の分子式を  $C_{47}H_{67}O_{13}N_8S$  (calcd for  $C_{47}H_{68}O_{13}N_8S$ : 1166.5621,  $\Delta +11.6$  mmu) と決定した。

$^1H$ - および  $^{13}C$ -NMR スペクトルデータ (Table 4-4.) から、**8** はペプチドであることが示唆されたので、**8** を酸加水分解後 (6 M HCl, 110 °C, 20 hr)、構成アミノ酸を分析したところ、homotyrosine (Hty), threonine (Thr), glutamic acid (Glu), methionine (Met), *N*-methyltyrosine (*N*-Me-Tyr) および isoleucine (Ile) が確認された。また、光学異性体の分析から、これらのアミノ酸は全て L 型であることを確認した。さらに、**8** はニンヒドリン試薬には陰性であったことから、N 末端が修飾されているか、環状ペプチドであることが示唆された。

**8** の  $^1H$ -NMR スペクトル (Fig. 4-17.) において、5.06 ppm に broad singlet が観察され、2 次元 NMR スペクトルを詳細に検討した結果、他の oscillapeptin 類と同様に Ahp 残基の存在を確認した。また、 $^1H$ -NMR スペクトルにおいて 1.99 ppm に singlet のメチル基が観察され、HMBC スペクトルでこのメチル基水素と 173.3 ppm のカルボニル炭素に相関ピークが観察されたことから、アセチル基の存在を確認した。

HMBC および ROESY スペクトルを詳細に検討することにより、**8** のアミノ酸の配列を決定した。

これらの結果から、oscillapeptin C (**8**) の構造を Fig. 4-16. のように決定した。

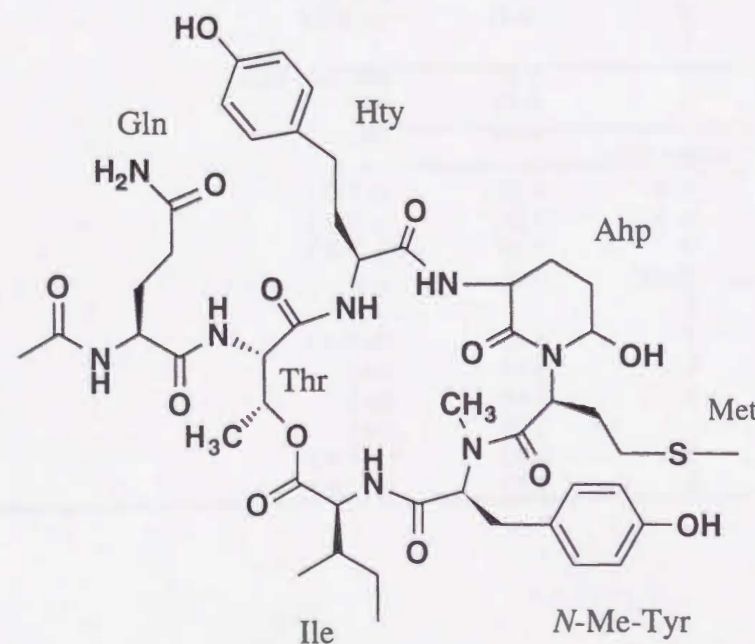


Fig. 4-16. Structure of oscillapeptin C (**8**).

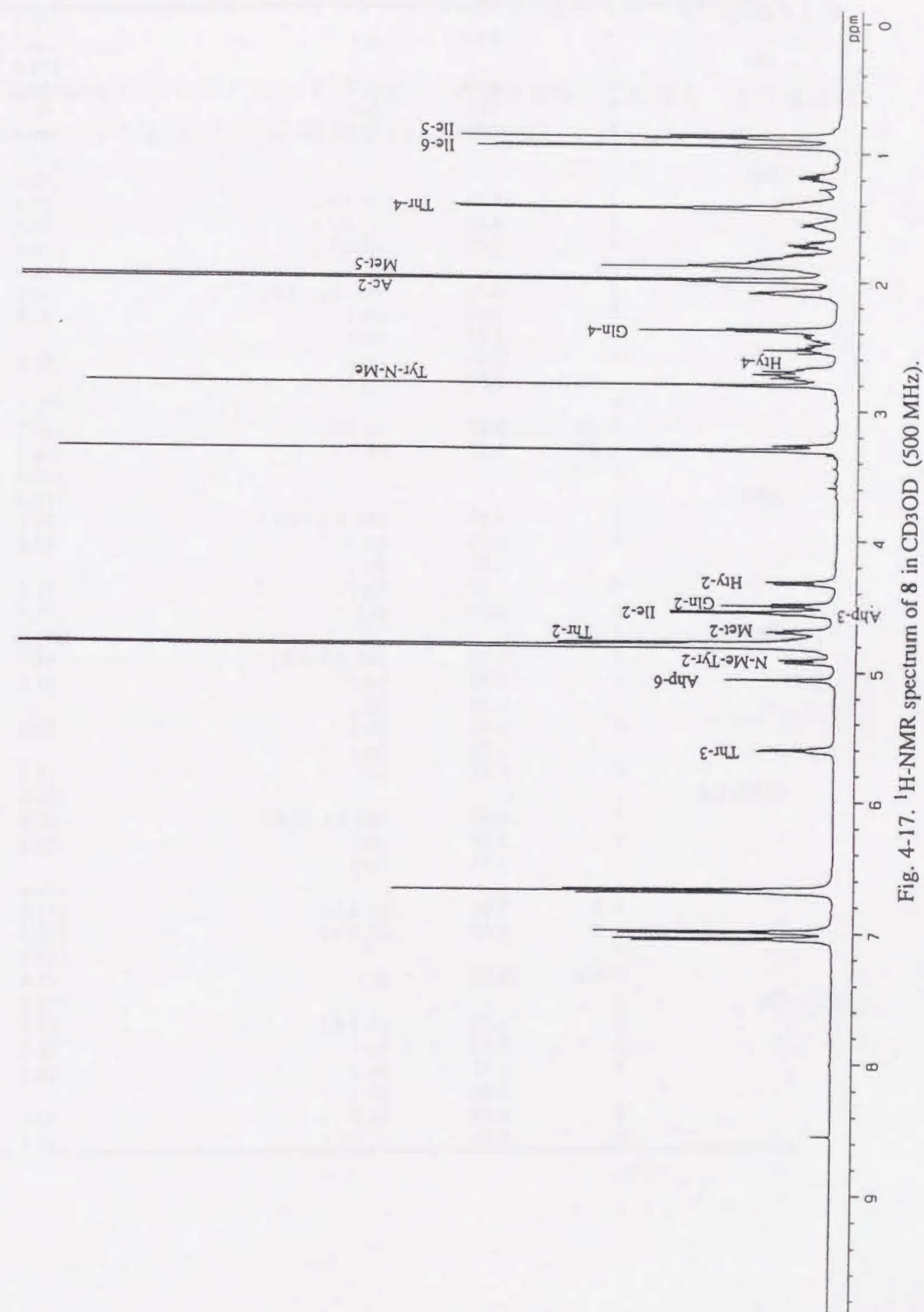


Fig. 4-17.  $^1H$ -NMR spectrum of **8** in  $CD_3OD$  (500 MHz).

Table 4-4.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for oscillapeptin C in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Position		$^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$
Acetyl	1			173.3
	2	1.99	(s)	22.4
Gln	1			174.9
	2	4.50	(t, 7.6)	54.2
	3	2.09	(m)	29.0
	4	2.38	(t, 7.6)	32.4
	5			177.9
Thr	1			172.1
	2	4.77	(d, 1.2)	57.5
	3	5.61	(q, 6.7)	73.2
	4	1.43	(d, 6.7)	18.6
Hty	1			174.2
	2	4.32	(dd, 3.1, 11.0)	54.3
	3	2.43	(m)	33.6
		1.85	(m)	
	4	2.69	(m)	31.9
		2.52	(m)	
	5			132.5
	6, 10	6.99	(d, 8.6)	130.7
	7, 9	6.67	(d, 8.6)	116.3
	8			156.9
Ahp	2			171.0
	3	4.56	(dd, 6.7, 12.8)	51.1
	4	2.75	(m)	22.4
		1.82	(m)	
	5	1.87	(m)	31.2
Met	6	5.06	(s)	75.9
	1			173.0
	2	4.70	(dd, 5.8, 8.5)	51.7
	3	1.56	(m)	31.3
		1.38	(m)	
N-Me-Tyr	4	1.80	(m)	30.8
		1.72	(m)	
	5	1.97	(s)	15.5
	1			171.9
	2	4.92	(dd, 3.1, 11.6)	63.3
	3	3.28	(m)	34.2
		2.72	(m)	
	4			129.0
	5, 9	7.04	(d, 8.6)	131.8
	6, 8	6.68	(d, 8.6)	116.5
Ile	7			157.7
	N-Me	2.80	(s)	31.4
	1			175.2
	2	4.55	(d, 7.6)	57.7
	3	2.54	(m)	38.2
	4	1.43	(m)	26.4
		1.18	(m)	
	5	0.95	(d, 6.7)	10.8
	6	0.88	(t, 7.6)	16.4

## 第4節 Oscillapeptin 類の生理活性

Oscillapeptin B はトリプシンの活性を強力に阻害し、その  $\text{IC}_{50}$  は  $7 \times 10^{-9} \text{ M}$  であった。しかし、oscillapeptin B はキモトリプシンの活性を  $2 \times 10^{-5} \text{ M}$  でも全く阻害しなかった。

Oscillapeptin G, A, および C はキモトリプシンの活性を強力に阻害し、その  $\text{IC}_{50}$  はそれぞれ、 $4 \times 10^{-9} \text{ M}$ ,  $3 \times 10^{-9} \text{ M}$ , および  $7 \times 10^{-8} \text{ M}$  であった。



## 第5節 考察

Oscillapeptin 類は Ahp を含む環状デプシペプチドであるが、Ahp を含むデプシペプチドの最初の例は Pettit らにより1989年にタツナミガイ *Dolabella auricularia* から単離された dolastin 13 が知られている<sup>38)</sup>。Dolastin 13 は分子内に Dhb 残基および O-Me-glyceric acid を含んでおり、強い細胞毒性を示す。

最近、藍藻 *Microcystis aeruginosa* および *Microchaete lohtakensis* から Ahp を含む環状デプシペプチド micropeptins<sup>39),40)</sup>, aeruginopeptins<sup>41)</sup>, microcystilide A<sup>42)</sup>, cyanopeptorin<sup>43)</sup>, A90720A<sup>44),45)</sup> などが相次いで単離された。また、糸状藍藻 *Oscillatoria agardhii* からは、我々とほぼ同時期に Murakami らにより Ahp を含む環状デプシペプチド oscillapeptin が単離された<sup>46)</sup>。

本研究において単離した oscillapeptins は、異常アミノ酸として Ahp の他に homo-tyrosine を含み、G, A および B は N 末端に glyceric acid がアミド結合している。glyceric acid が硫酸エステルやメチルエーテルとなっている同様の化合物はいくつか単離されていたが、glyceric acid の水酸基が未修飾のものを単離したのは、我々が初めてである。また、これらのトリプシンおよびキモトリプシンに対する阻害活性は IC<sub>50</sub> が nM レベルと非常に強力であった。

これらの Ahp を含む環状ペプチドの構造と酵素阻害特異性を検討したところ、oscillapeptin B (7) の Lys 残基の位置に Lys あるいは Arg 残基があるもの (micropeptins, A90720A) は、トリプシンに対して高い特異性を持っていることが確認された。すなわち、この位置に正の電荷を持つことがトリプシンに対する特異性に関与することが示唆された。また、この位置が疎水性の残基 (Hty, Leu, ThTyr) で置換されるとトリプシンは阻害しなくなり、代わってキモトリプシンに対して高い特異性を持つようになることが示唆された。

また、oscillapeptin B において、Ile-2 の6位メチル基の化学シフトが -0.11 ppm と異常に高磁場にシフトしているのが観察された。さらに oscillapeptin B において、溶媒と NH との交換速度が非常に遅い水素があることが示唆されており、ある種の包接化合物のような働きをする可能性を持っていることが考えられ、その3次元構造および新たな生理活性に興味もたれる。

## 第5章 ウレイド結合を含む新規環状ペプチド Oscillamide A~C, H, および Y

### 第1節 Oscillamide 類の単離

#### (1) Oscillamide A および Y の単離

10 L の培養瓶を用いて CT 培地中で *Oscillatoria agardhii* (NIES-610 = CCAP 1459/22 = NIVA CYA 18) の通気培養を行った。1120 L の培養液から藻体を連続遠心分離により集め、凍結乾燥藻体 99.1 g を得た。乾燥した藻体を CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 1:3:1 に懸濁し、可溶性成分を抽出した。5% 酢酸水溶液に減圧乾固した抽出物を懸濁し、遠心分離により不溶物を除いた後、上清を Sep Pak ODS カートリッジに吸着させた。20% MeOH でカートリッジを洗浄した後、90% MeOH で溶出されてくる画分を、逆相 HPLC (Ultron ODS, 20 x 250 mm; 55% MeOH, 50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) で精製することにより oscillamide Y (9, 51.1 mg, 乾燥重量の 0.05%) および oscillamide A (10, 25.2 mg, 乾燥重量の 0.03%) をそれぞれ単離した。

#### (2) Oscillamide B の単離

80 L の CT 培地を用いて通気培養を行い、得られた凍結乾燥 *Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/11A) 9.0 g に 400 mL の MeOH を加えて抽出液を得た。抽出液を減圧乾固後、5% 酢酸水溶液に懸濁させた。遠心上清を Sep Pak ODS カートリッジに吸着させ、20% MeOH で洗浄した。カートリッジから 90% MeOH で溶出された画分を減圧乾固した後、20% MeOH に溶解し逆相 HPLC (Mightysil ODS, 20 x 250 mm; 65% MeOH, 50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) および順相 HPTLC (Silica gel 60 F254, 0.25 mm, CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 60:40:10) で精製することにより oscillamide B (11, 21.0 mg, 乾燥重量の 0.23%) を単離した。

#### (3) Oscillamide C の単離

CT 培地 80 L から得られた 7.7 g の凍結乾燥 *Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/14) に 400 mL の MeOH を加え、MeOH 抽出画分を得た。減圧下濃縮した抽出物を 5% 酢酸水溶液に懸濁し、不溶物を遠心分離により除去した。Sep Pak ODS カートリッジに上清を吸着させた後、20% MeOH でカートリッジを洗浄した。90% MeOH 溶出画分を減圧乾固した後、溶出物を 20% MeOH に溶解し逆相 HPLC (Mightysil ODS, 20 x 250 mm; 65% MeOH, 50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) および順相 HPTLC (Silica gel 60 F254, 0.25 mm, CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 60:40:10) で精製を行い oscillamide C (12, 7.7 mg, 乾燥重量の 0.1%) を単離した。

#### (4) Oscillamide H の単離

*Oscillatoria agardhii* (NIES-595) を 80 L の CT 培地を用いて通気培養し、7.0 g の凍



結乾燥藻体を得た。得られた藻体に 400 mL の MeOH を加えて可溶性成分を抽出し、減圧下濃縮した。5 % 酢酸水溶液に抽出物を懸濁し、遠心分離で不溶物を除いた後、Sep Pak ODS カートリッジに吸着させた。カートリッジを 20 % MeOH で洗浄後、90 % MeOH で溶出した。90 % MeOH で溶出された画分を減圧乾固後、20 % MeOH に溶解し逆相 HPLC (Ultron ODS, 8 x 250 mm; 55 % MeOH, 50 mM 磷酸緩衝液 pH 3.0) および順相 HPTLC (Silica gel 60 F254, 0.25 mm, CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 60:40:10) で精製を行うことにより oscillamide H (13, 7.5 mg, 乾燥重量の 0.1 %) を単離した。

## 第 2 節 Oscillamide Y の構造解析

Oscillamide Y (9) は無色の固体で、UV スペクトルにおいて 275 nm に極大吸収を示した。正イオンモードの FABMS スペクトル (Fig. 5-3.) では、疑似分子イオンピークが  $m/z$  858 に観察された。高分解能 FABMS スペクトル ( $m/z$  858.4369,  $[M+H]^+$ ) の結果から、分子式は C<sub>45</sub>H<sub>59</sub>O<sub>10</sub>N<sub>7</sub> (calcd for C<sub>45</sub>H<sub>60</sub>O<sub>10</sub>N<sub>7</sub>: 858.4402,  $\Delta +0.6$  mmu) と決定した。<sup>1</sup>H- および <sup>13</sup>C-NMR スペクトルデータ (Table 5-1.) から、9 はペプチド性の化合物であることが示唆されたので、ニンヒドリン試薬による発色を試みた。ニンヒドリンには陰性であったことから、環状ペプチドとなっているか N 末端が修飾されていることが示唆された。

9 を通常の酸加水分解条件で加水分解後にアミノ酸分析を行ったところ、NMR で確認された Lys および Tyr がほとんど検出されなかった。そこで、反応温度を高くして酸加水分解 (6 M HCl, 150 °C, 10 hr) をした後、構成アミノ酸を分析したところ、homotyrosine (Hty), tyrosine (Tyr), phenylalanine (Phe), lysine (Lys), *N*-methylalanine (*N*-Me-Ala), isoleucine (Ile) が確認された。また、chiral な GC カラムを用いた分析および Marfey 法による分析から、これらのアミノ酸の立体配置は Lys のみが D 型で、残りのアミノ酸は L 型であることを確認した。

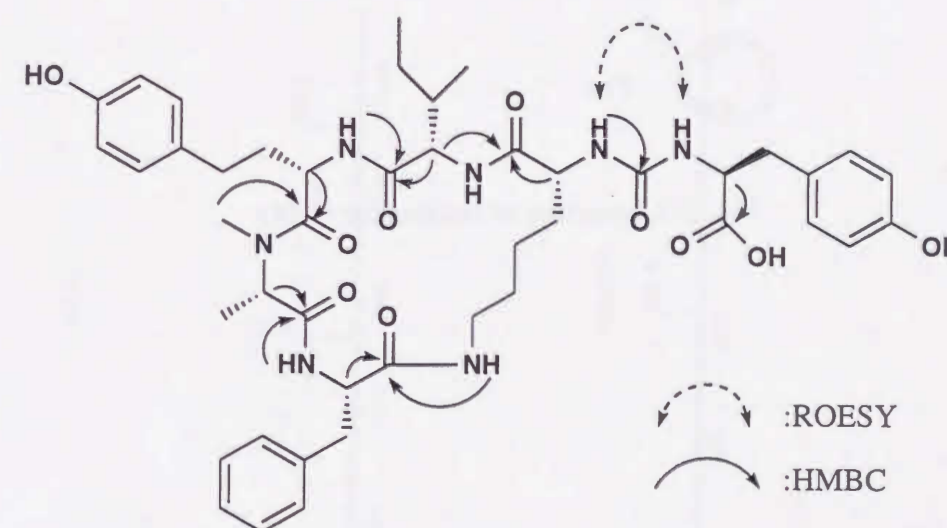


Fig. 5-1. HMBC and ROESY correlations of 9.

9 の <sup>1</sup>H- および <sup>13</sup>C-NMR スペクトル (Fig. 5-4, 5.) におけるシグナルは 2 次元 NMR (Fig. 5-6, 7, 8.) を詳細に検討することにより帰属した。アミノ酸の配列は主に HMBC スペクトル (Fig. 5-8.) において、 $\alpha$ -NH とカルボニル炭素との相関ピークにより解析した。*N*-Me-Ala と Hty との結合は、*N*-メチル基と 172.1 ppm の Hty のカルボニル炭素との間に相関ピークが観察されたことから確認した。Lys と Ile との結合



は Lys の  $\alpha$  位水素 (4.16 ppm) と Ile のカルボニル炭素 (174.1 ppm) との間に相関ピークが観察されたことより確認した。また、HMBC スペクトルにおいて Lys の  $\alpha$ -NH から 158.2 ppm のカルボニル炭素に相関ピークが観察された。ROESY スペクトルにおいて Lys の  $\alpha$ -NH と Tyr の NH との間に相関ピークが観察された。さらに、**9** は通常の酸加水分解の条件 (6 M HCl, 110 °C, 20 hr) では、ウレイド部分が加水分解されず、Lys および Tyr がほとんど検出されなかった。これらのことから **9** がウレイド結合を含むことを確認した。

以上の結果より、oscillamide Y (**9**) の構造を Fig. 5-2. のように決定した<sup>47)</sup>。

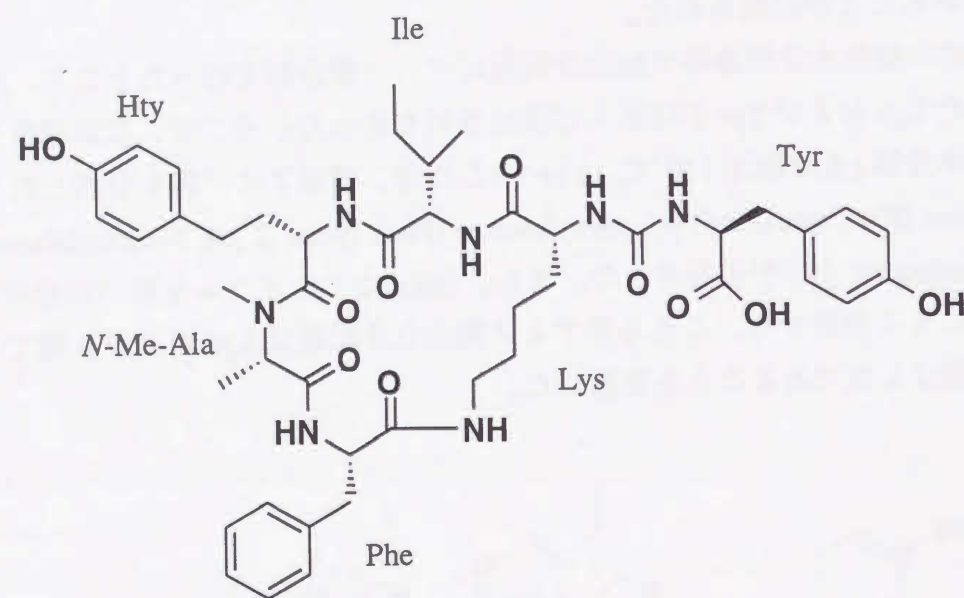


Fig. 5-2. Structure of oscillamide Y (**9**).

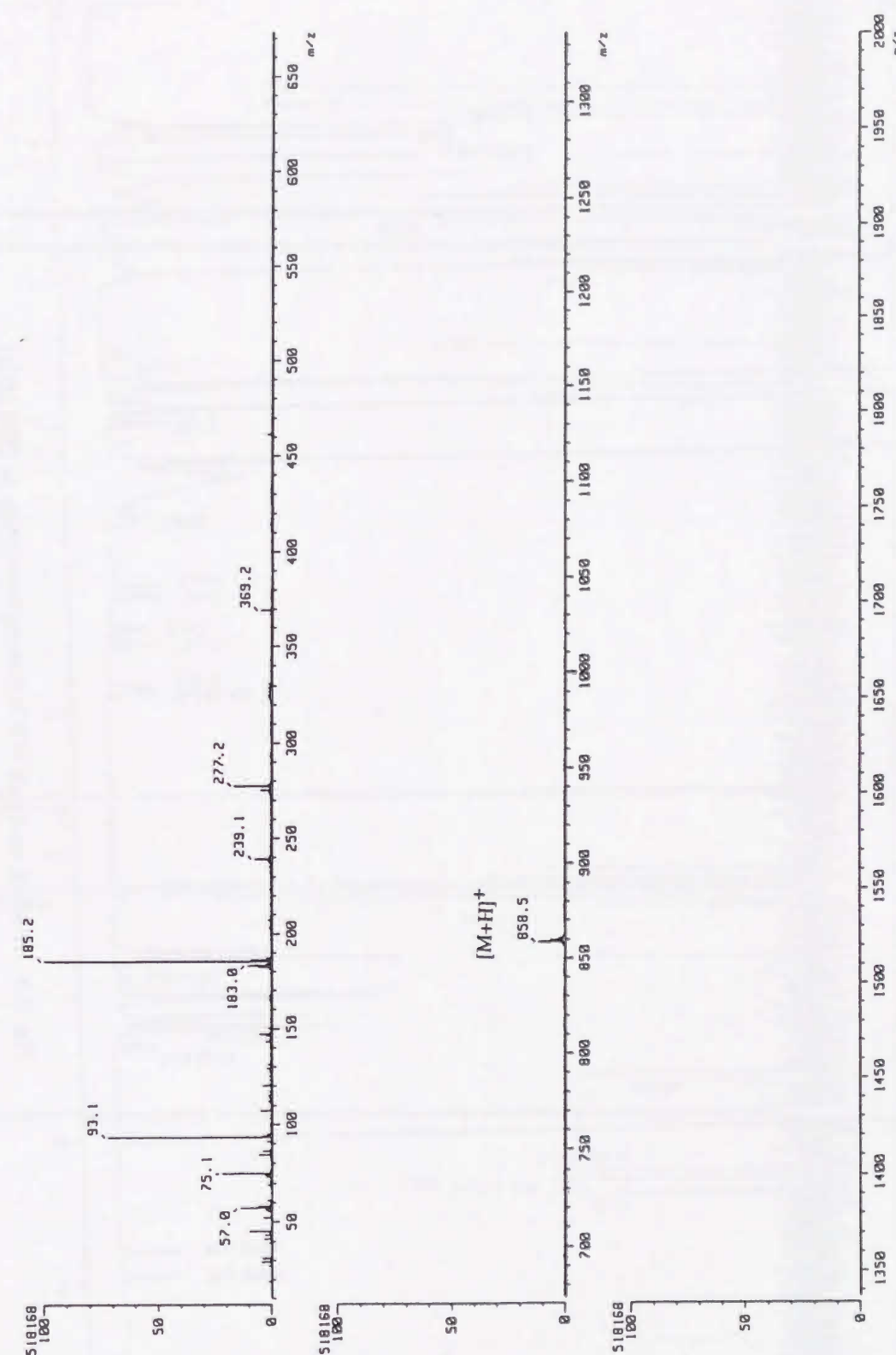


Fig. 5-3. Positive FAB/MS spectrum of **9** using glycerol as a matrix.

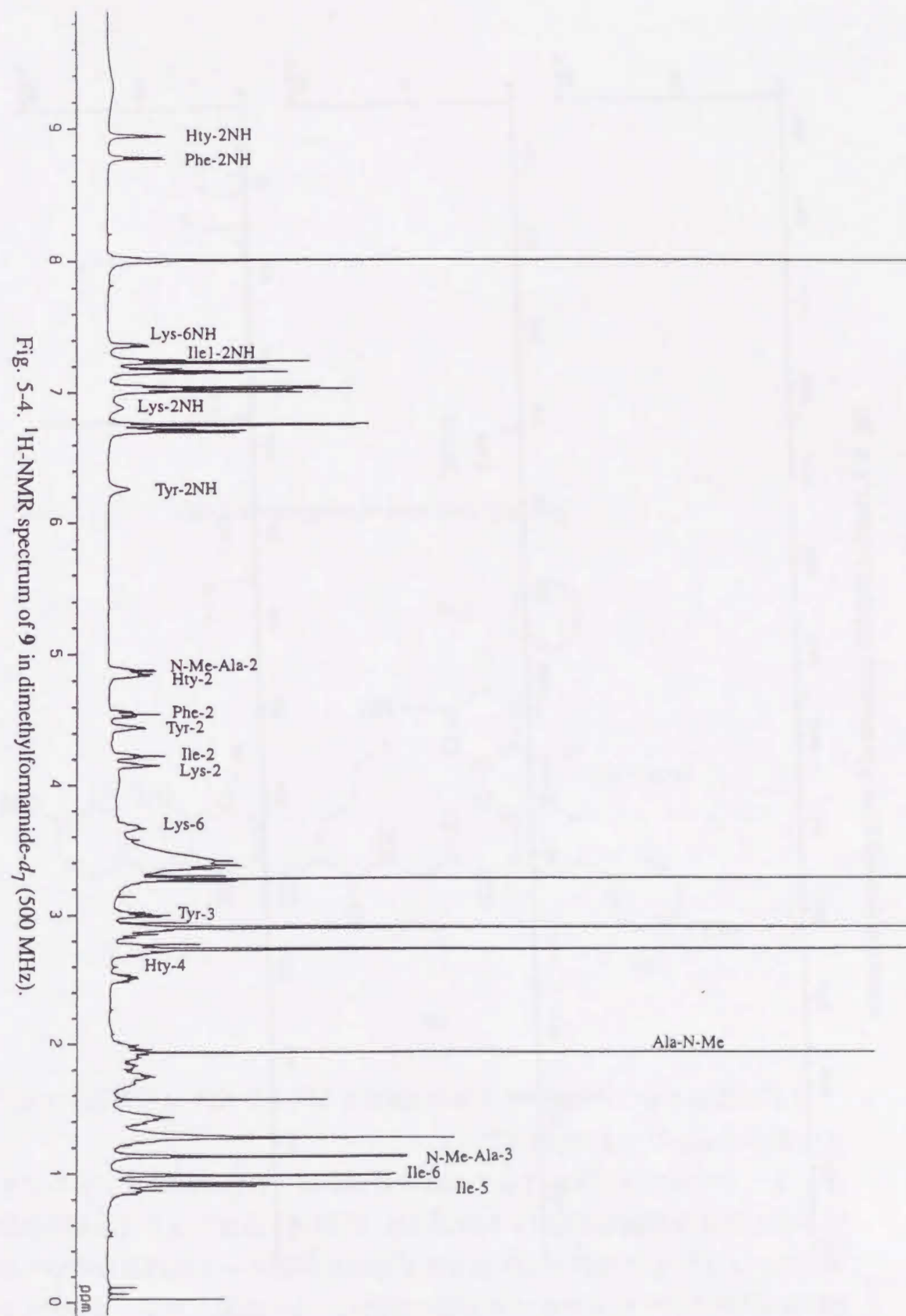
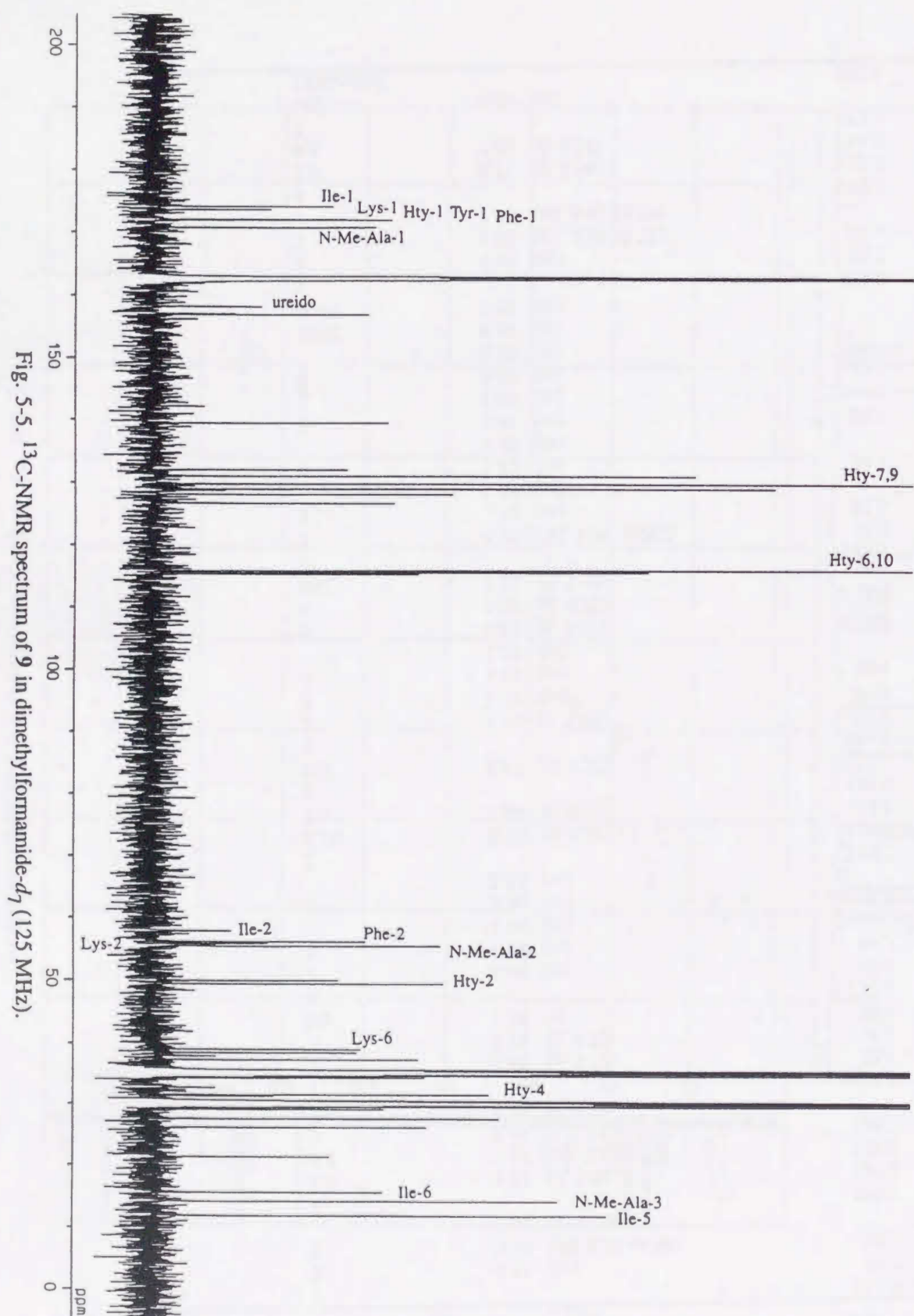
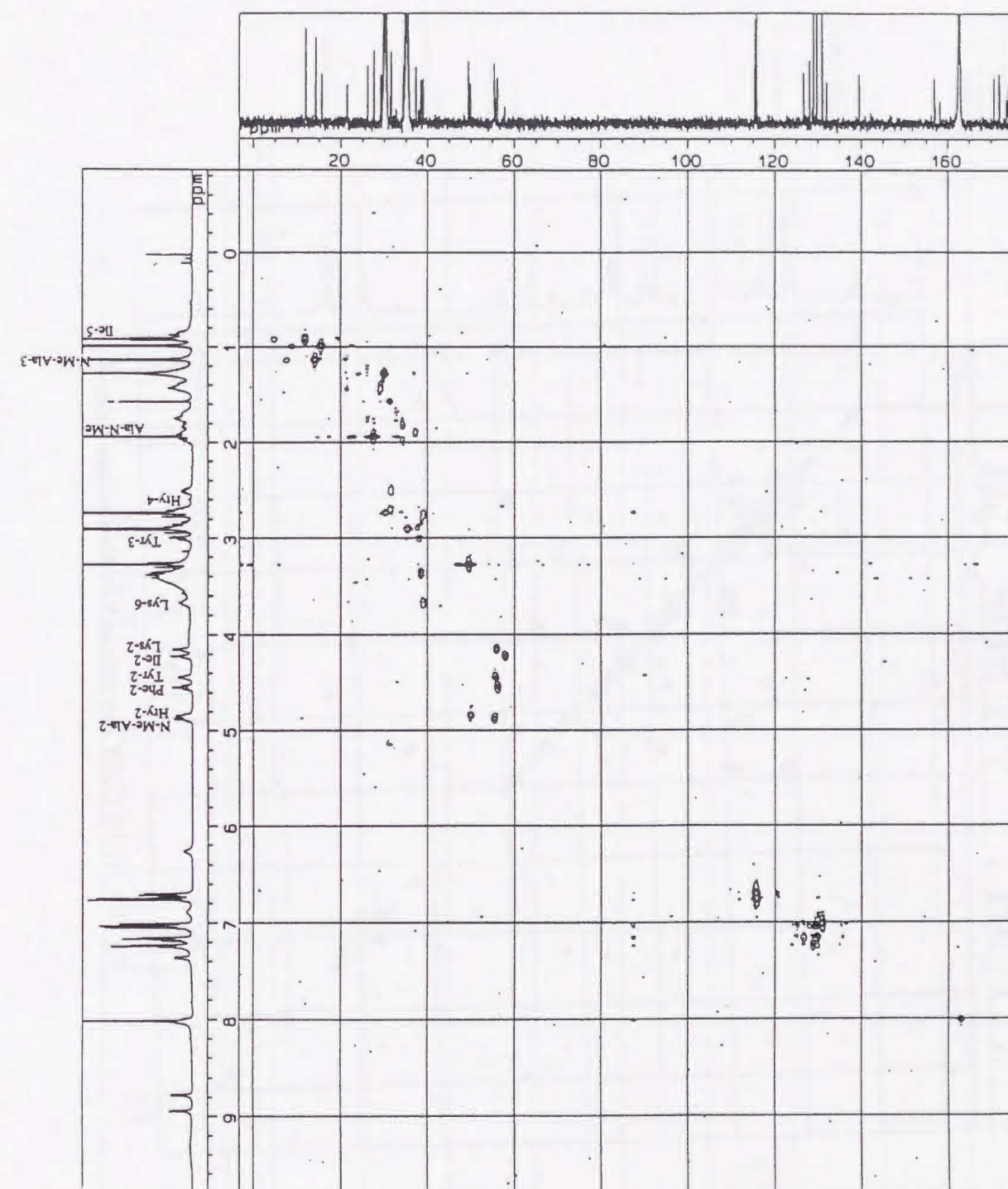




Table 5-1.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for oscillamide Y in dimethylformamide- $d_7$ .

Position	$^1\text{H}$	$J(\text{Hz})$	$^{13}\text{C}$
Phe	1		171.9
	2	4.55 (m)	56.2
	3	3.39 (dd, 3.36, 14.06)	38.5
		2.84 (d, 14.06)	
	4		139.5
	5,9	7.25 (d, 7.02)	129.0
	6,8	7.17 (dd, 7.02, 7.32)	129.8
N-Me-Ala	7	7.16 (t, 7.32)	126.7
	NH	8.78 (d, 9.16)	
	1		170.7
	2	4.88 (q, 6.72)	55.4
Hty	3	1.14 (d, 6.72)	14.2
	Me	1.94 (s)	29.1
	1		172.1
	2	4.84 (m)	49.4
Ile	3	1.98 (m)	34.3
		1.84 (m)	
	4	2.70 (m)	31.3
		2.52 (m)	
	5		128.1
	6,10	6.76 (d, 8.55)	115.9
	7,9	7.04 (d, 8.55)	129.8
	8		156.9
Lys	NH	8.95 (d, 4.27)	
	1		174.1
	2	4.23 (t, 7.02)	57.9
	3	1.91 (m)	37.3
	4	1.75 (m)	26.1
		1.23 (m)	
Tyr	5	0.92 (t, 7.03)	11.9
	6	0.99 (d, 6.72)	15.6
	NH	7.25 (d, 7.02)	
	1		173.6
	2	4.16 (dd, 6.39, 10.97)	55.9
	3	1.78 (m)	32.8
		1.69 (m)	
	4	1.42 (m)	29.1
		1.40 (m)	
	5	1.44 (m)	21.4
Tyr		1.27 (m)	
	6	3.67 (m)	39.1
		2.70 (m)	
	2-NH	6.89 (br)	
	6-NH	7.36 (br)	
	1		171.9
	2	4.44 (m)	55.7
	3	3.01 (dd, 5.19, 13.73)	38.0
		2.88 (dd, 6.41, 13.73)	
	4		115.3
Tyr	5,9	6.71 (d, 8.54)	115.5
	6,8	7.02 (d, 8.54)	131.0
	7		157.1
	NH	6.26 (br)	
	CO(ureido)		158.2

Fig. 5-6.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spectrum of 9 in dimethylformamide- $d_7$ .

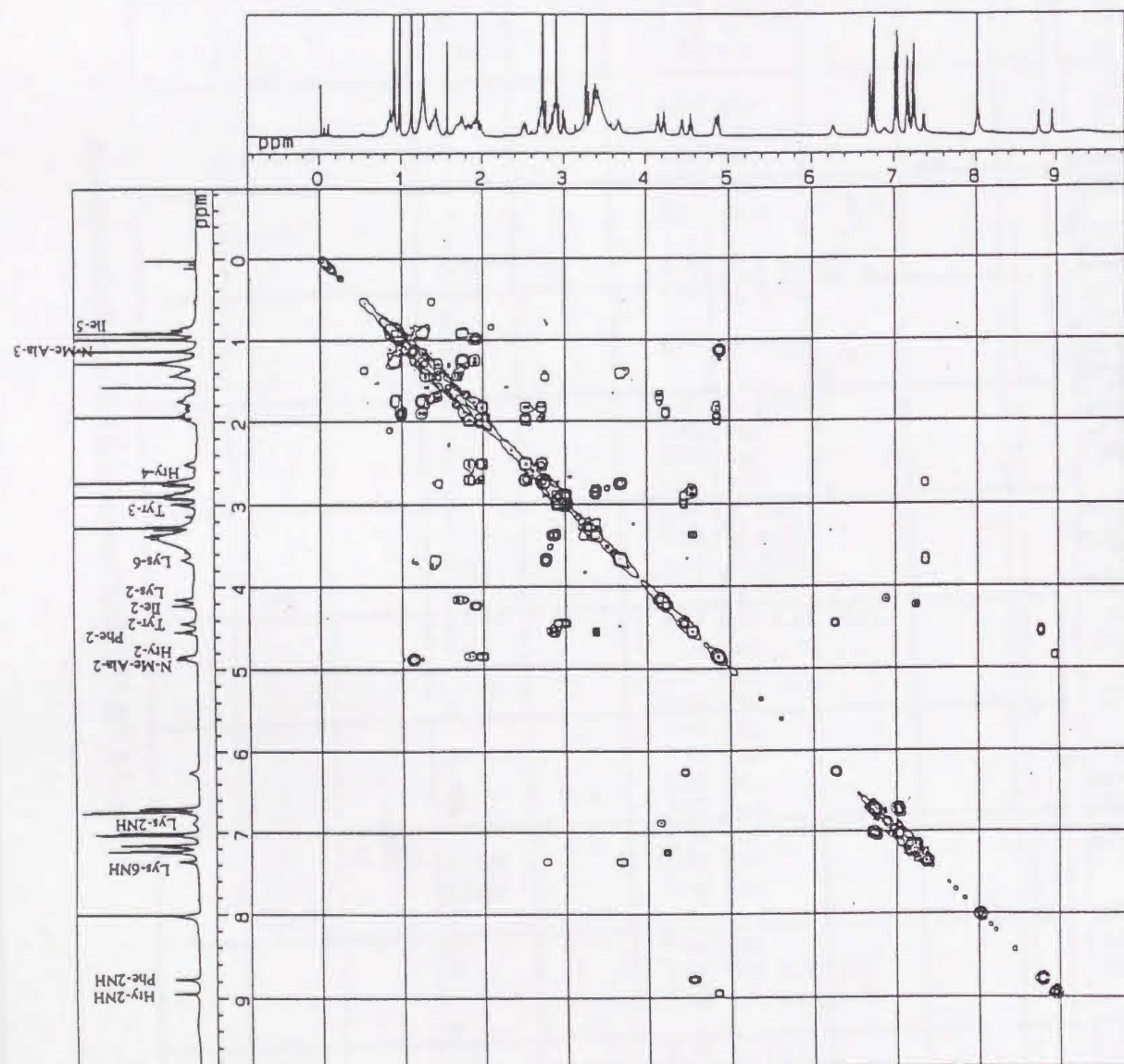


Fig. 5-7.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum of 9 in dimethylformamide- $d_7$ .



Fig. 5-8.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBBC spectrum of 9 in dimethylformamide- $d_7$ .



### 第3節 Oscillamide A～C および H の構造解析

#### (1) Oscillamide A の構造解析

Oscillamide A (**10**) は無色の固体で、正イオンモードの FABMS スペクトルでは、 $m/z$  851 に疑似分子イオンピークが観察された。高分解能 FABMS スペクトル ( $m/z$  851.4818,  $[M+H]^+$ ) の結果より、**10** の分子式は  $C_{42}H_{62}O_9N_{10}$  (calcd for  $C_{42}H_{63}O_9N_{10}$ : 851.4779,  $\Delta +3.9$  mmu) と決定した。また、UV スペクトルは 279 nm に極大吸収を示した。

**10** はペプチドであることが  $^1H$ - および  $^{13}C$ -NMR スペクトルデータ (Table 5-2.) から示唆された。**10** を酸加水分解後 (6 M HCl, 150 °C, 10 hr)、アミノ酸組成を分析したところ、homotyrosine (Hty), arginine (Arg), phenylalanine (Phe), lysine (Lys), *N*-methyl-alanine (*N*-Me-Ala), isoleucine (Ile) が確認された。また、Marfey 法および chiral な GC カラムを用いた光学異性体の分析から、Lys のみが D 型で、残りのアミノ酸は L 型であることを確認した。

この分子式およびアミノ酸組成から **10** は oscillamide Y (**9**) の Tyr が Arg に置換された化合物と推察された。

2次元 NMR を詳細に検討することにより  $^1H$ - (Fig. 5-10.) および  $^{13}C$ -NMR スペクトルのシグナルを帰属した。

**10** の 1次元および2次元 NMR スペクトルを詳細に検討し、oscillamide A (**10**) は Fig. 5-9. に示す構造であると決定した。

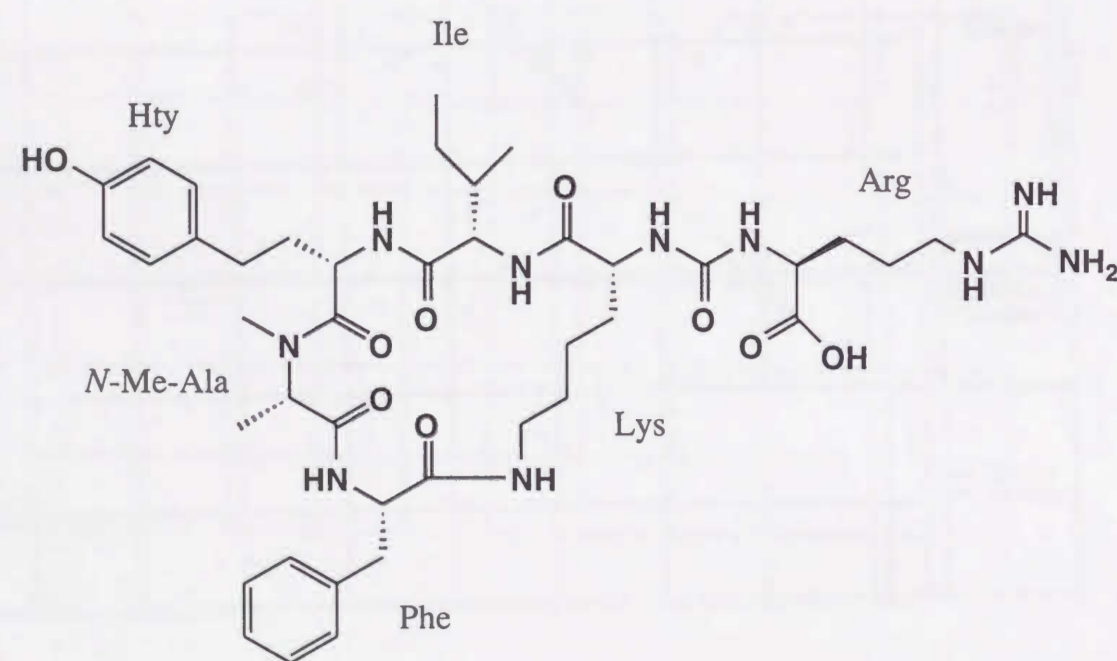


Fig. 5-9. Structure of oscillamide A (**10**).

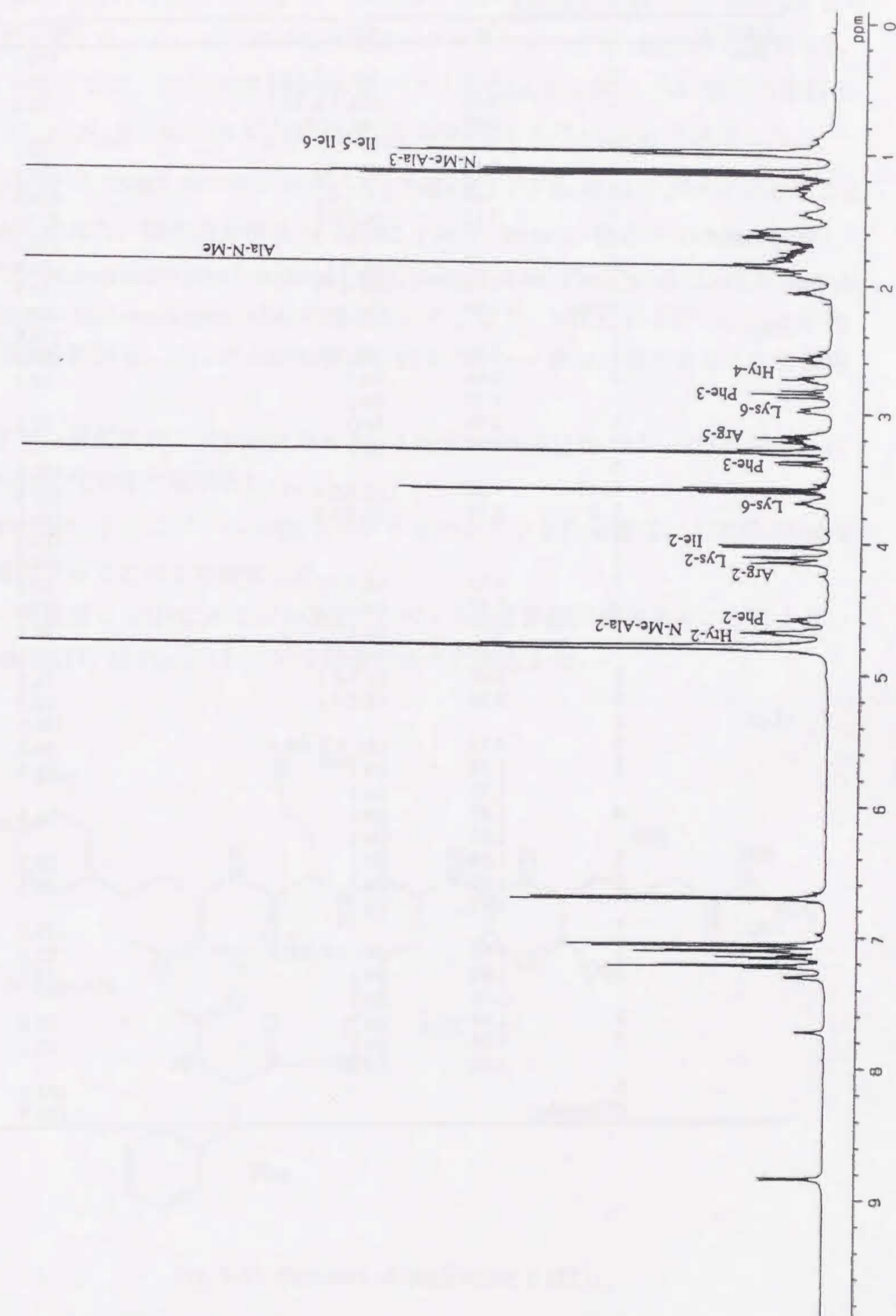


Fig. 5-10.  $^1H$ -NMR spectrum of **10** in  $CD_3OD$  (500 MHz).

Table 5-2.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for oscillamide A in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Position		$^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$
Phe	1			174.1
	2	4.59	(dd, 3.6, 12.8)	56.8
	3	3.38	(dd, 3.6, 13.7)	38.9
		2.85	(dd, 12.8, 13.7)	
	4			139.1
N-Me-Ala	5, 9	7.11	(d, 7.0)	130.1
	6, 8	7.22	(t, 7.0)	129.8
	7	7.15	(t, 7.0)	127.7
	1			172.3
	2	4.67	(q, 6.7)	56.4
Hty	3	1.14	(d, 6.7)	14.3
	N-Me	1.86	(s)	28.3
	1			173.9
	2	4.69	(dd, 4.9, 9.2)	50.3
	3	2.06	(m)	34.7
Ile		1.79	(m)	
	4	2.74	(m)	32.1
		2.57	(m)	
	5			132.8
	6, 10	7.06	(d, 8.5)	130.6
Lys	7, 9	6.71	(d, 8.5)	116.3
	8			157.0
	1			174.9
	2	4.02	(d, 9.2)	60.0
	3	1.92	(m)	37.6
Arg	4	1.77	(m)	26.7
		1.26	(m)	
	5	1.00	(t, 7.3)	12.1
	6	0.99	(d, 6.4)	16.3
	1			176.2
N-Me-Ala	2	4.11	(dd, 4.3, 5.8)	56.6
	3	1.88	(m)	32.6
		1.70	(m)	
	4	1.47	(m)	21.9
		1.32	(m)	
Phe	5	1.58	(m)	29.3
	6	3.69	(m)	40.2
		2.97	(m)	
	1			179.3
	2	4.15	(dd, 4.8, 7.0)	55.5
Arg	3	1.84	(m)	32.1
		1.63	(m)	
	4	1.64	(m)	26.0
	5	3.23	(m)	42.1
		3.18	(m)	
CO(ureido)	6			158.6
				159.7

## (2) Oscillamide Bの構造解析

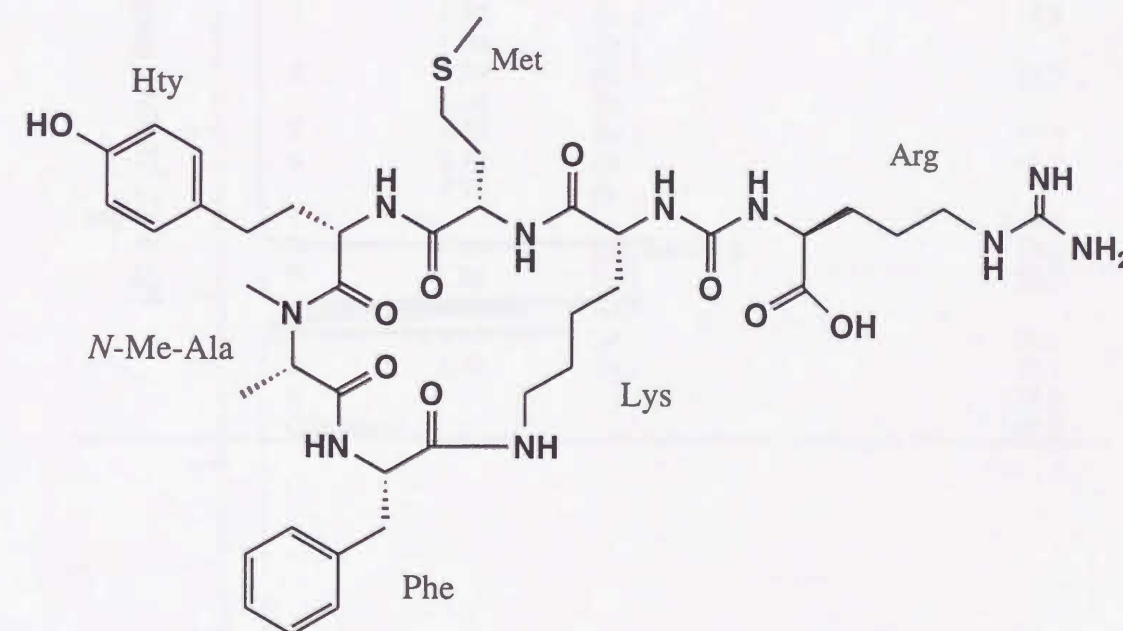
Oscillamide B (**11**) は無色の固体で、279 nm に UV 吸収極大を示した。FABMS スペクトルでは正イオンモードにおいて、疑似分子イオンピークが  $m/z$  869 に観察された。**11** の分子式は、高分解能 FABMS スペクトル ( $m/z$  851.4818,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) の解析から、 $\text{C}_{41}\text{H}_{60}\text{O}_9\text{N}_{10}\text{S}$  (calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{61}\text{O}_9\text{N}_{10}\text{S}$ : 869.4324,  $\Delta$  -2.0 mmu) と決定した。

$^1\text{H}$ - および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルデータ (Table 5-3.) から **11** はペプチドであることが示唆されたので、酸加水分解後 (6 M HCl, 150 °C, 10 hr)、構成アミノ酸を分析したところ、homotyrosine (Hty), arginine (Arg), phenylalanine (Phe), lysine (Lys), *N*-methyl-alanine (*N*-Me-Ala), methionine (Met) が確認された。また、HPLC および GC による光学異性体の分析から、Lys のみが D 型で、残りのアミノ酸は L 型であることを確認した。

このアミノ酸組成および分子式から **11** は oscillamide A (**10**) の Ile の位置が Met に置き換わった化合物と推察された。

$^1\text{H}$ - (Fig. 5-12.) および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルのシグナルの帰属は、2次元 NMR を詳細に検討することにより確認した。

これらの結果と HMBC および ROESY スペクトルを詳細に検討することにより、oscillamide B (**11**) は Fig. 5-11. に示す構造であると決定した。

Fig. 5-11. Structure of oscillamide B (**11**).



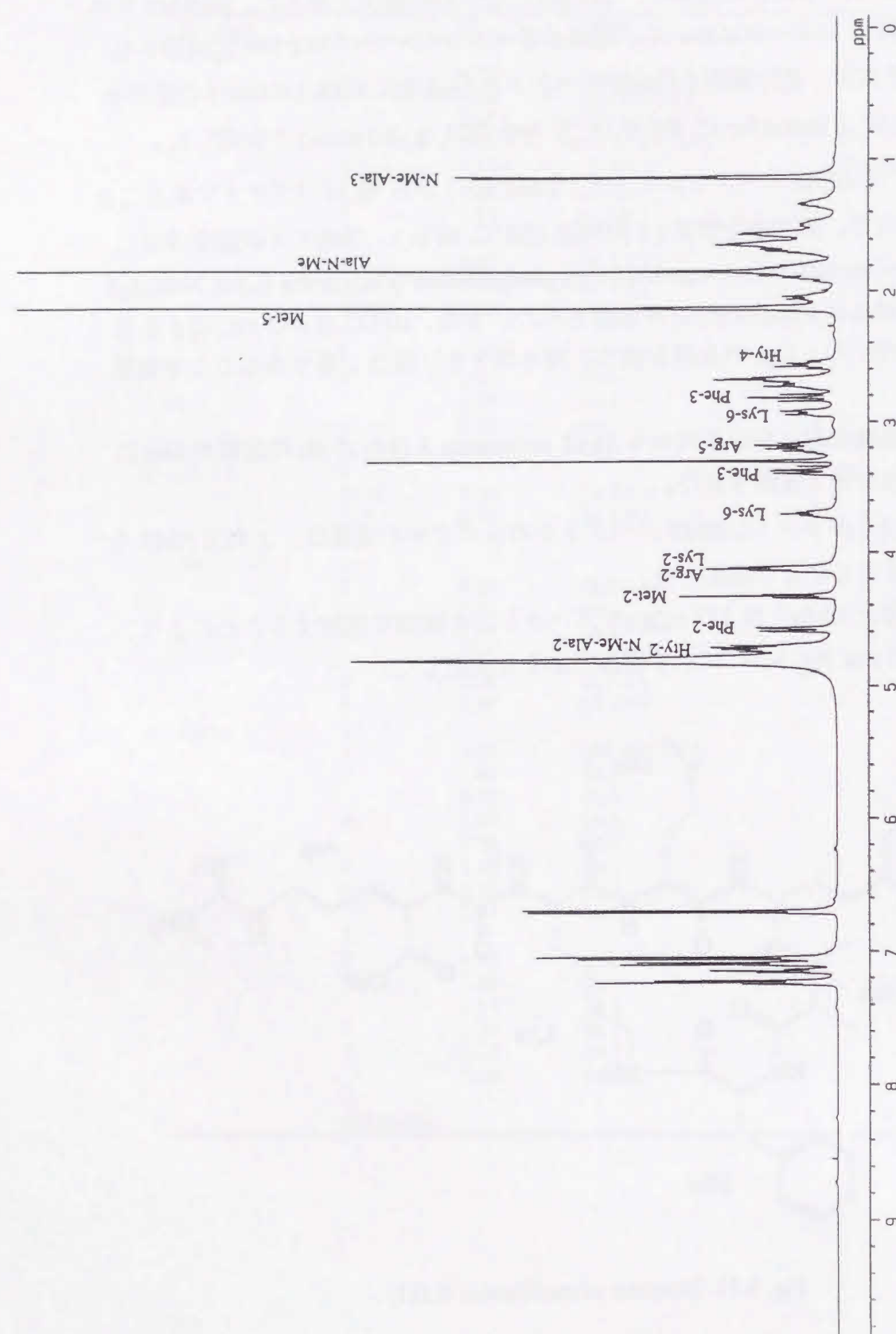


Fig. 5-12.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of 11 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).

Table 5-3.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for oscillamide B in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Position		$^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$
Phe	1			174.1
	2	4.59	(dd, 3.4, 12.8 )	56.8
	3	3.38	(dd, 3.4, 12.8 )	39.1
		2.82	(t, 12.8 )	
N-Me-Ala	4			139.0
	5, 9	7.10	(d, 7.3 )	130.1
	6, 8	7.24	(t, 7.3 )	129.9
	7	7.15	(t, 7.3 )	127.7
	1			172.2
	2	4.72	(q, 6.7 )	56.5
Hty	3	1.14	(d, 6.7 )	14.2
	N-Me	1.85	(s )	28.2
	1			174.1
	2	4.74	(dd, 5.2, 9.2 )	50.2
	3	2.05	(m )	34.7
		1.79	(m )	
	4	2.73	(m )	32.1
		2.57	(m )	
	5			132.7
	6, 10	7.06	(d, 8.2 )	130.5
	7, 9	6.71	(d, 8.2 )	116.4
	8			157.0
Met	1			175.1
	2	4.33	(t, 7.6 )	54.8
	3	2.13	(m )	32.0
	4	2.68	(m )	31.2
	5	2.13	(s )	15.5
Lys	1			176.4
	2	4.12	(dd, 4.3, 10.1 )	56.3
	3	1.90	(m )	32.8
		1.70	(m )	
	4	1.50	(m )	21.7
		1.34	(m )	
Arg	5	1.56	(m )	29.4
	6	3.70	(m )	40.0
		2.93	(m )	
	1			179.7
	2	4.14	(dd, 4.4, 6.0 )	55.6
	3	1.85	(m )	32.0
		1.67	(m )	
	4	1.63	(m )	26.1
	5	3.20	(m )	42.1
	6			158.6
CO(ureido)				159.8

### (3) Oscillamide Cの構造解析

Oscillamide C (**12**) は 279 nm に UV 吸収極大を示す無色の固体で、FABMS スペクトルにおいて、正イオンモードでの疑似分子イオンピークが  $m/z$  957 に観察された。疑似分子イオンピークの高分解能 FABMS スペクトル ( $m/z$  957.5198,  $[M+H]^+$ ) による解析から、分子式は  $C_{49}H_{68}O_{10}N_{10}$  (calcd for  $C_{49}H_{69}O_{10}N_{10}$ : 957.5198,  $\Delta +0.0$  mmu) と決定した。

**12** の  $^1H$ - および  $^{13}C$ -NMR スペクトルデータ (Table 5-4.) から、**12** はペプチド性の化合物であることが示唆された。そこで、酸加水分解 (6 M HCl, 150 °C, 10 hr) した後、アミノ酸分析をしたところ、homotyrosine (Hty), arginine (Arg), phenylalanine (Phe), lysine (Lys), *N*-methylhomotyrosine (*N*-Me-Hty), isoleucine (Ile) が確認された。また、アミノ酸の光学異性体の分析を chiral な GC カラムおよび Marfey 法を用いて行い、Lys のみが D 型で、残りのアミノ酸は L 型であることを確認した。

**12** は、この分子式およびアミノ酸組成から oscillamide A (**10**) の *N*-Me-Ala の位置に *N*-Me-Hty が置換した化合物と推察された。

**12** の  $^1H$ - (Fig. 5-14.) および  $^{13}C$ -NMR スペクトルにおけるシグナルは、2 次元 NMR スペクトルを詳細に検討することにより帰属した。

以上の結果および 2 次元 NMR スペクトルを詳細に検討し、oscillamide C (**12**) の構造を Fig. 5-13. のように決定した。

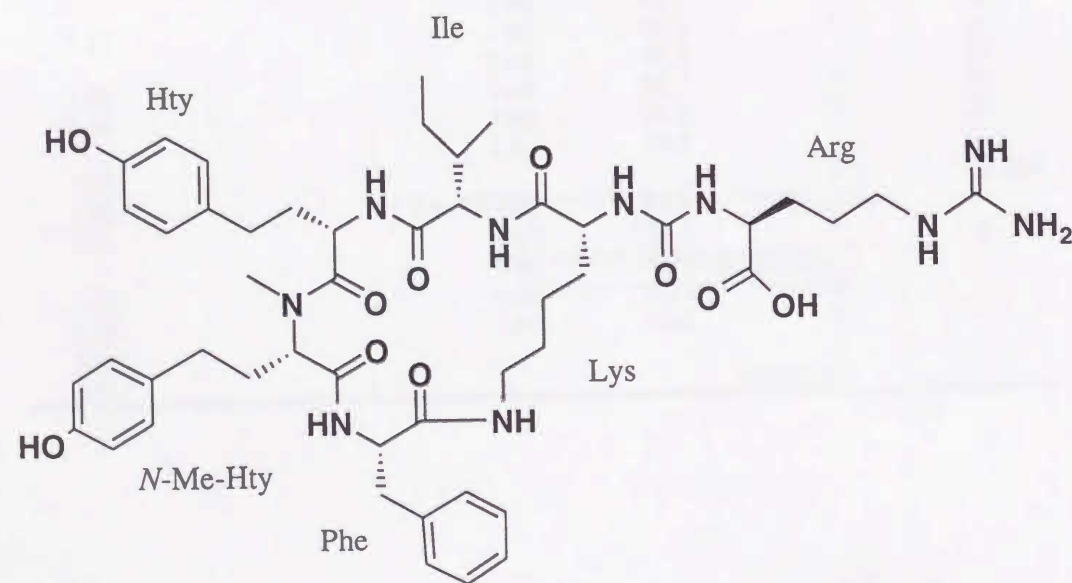


Fig. 5-13. Structure of oscillamide C (**12**).

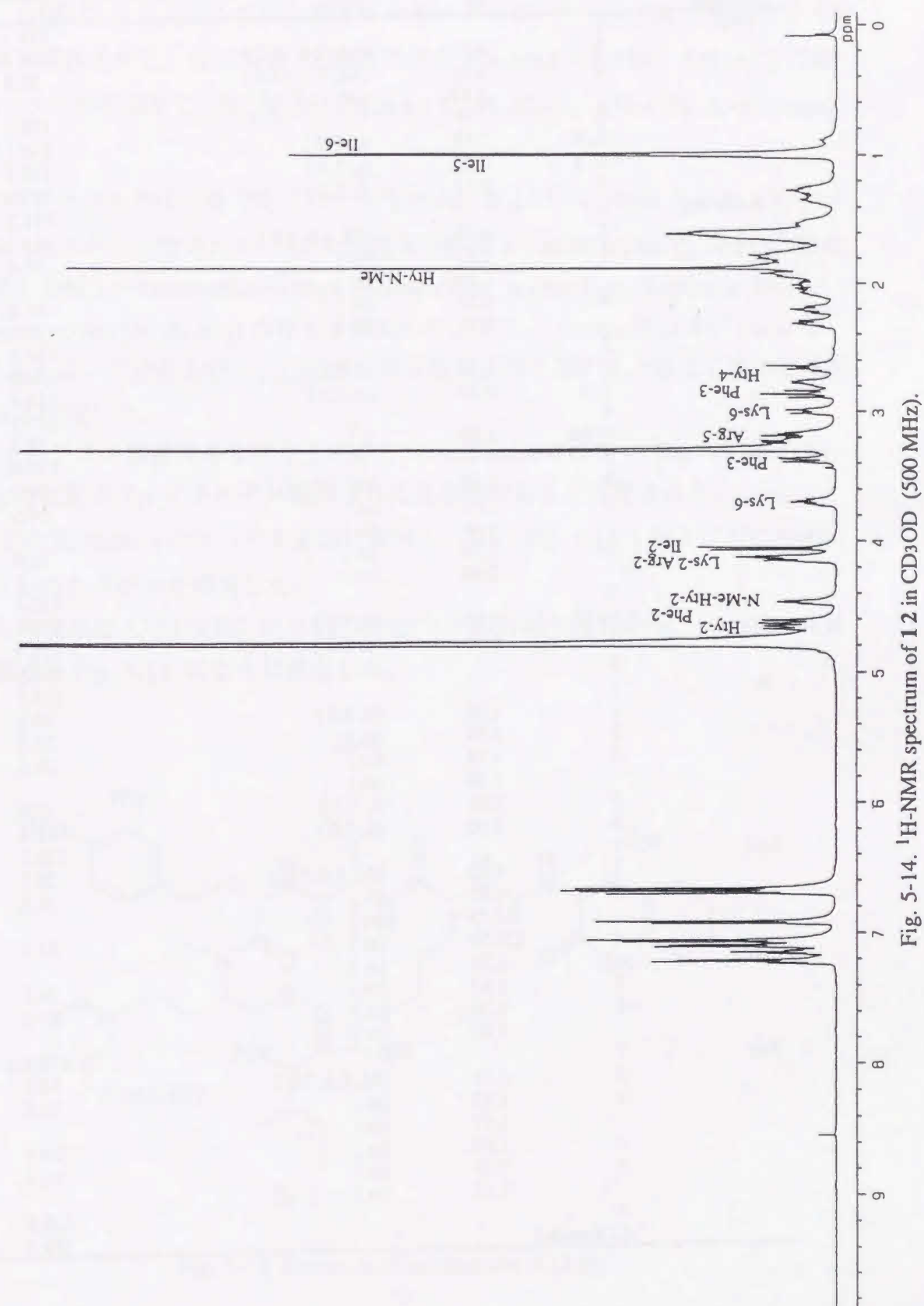


Fig. 5-14.  $^1H$ -NMR spectrum of **12** in  $CD_3OD$  (500 MHz).



Table 5-4.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for oscillamide C in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Position		$^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$
Phe	1			174.1
	2	4.62	(dd, 3.4, 12.5)	56.8
	3	3.38	(dd, 3.1, 14.0)	38.9
		2.87	(dd, 12.8, 14.0)	
N-Me-Hty	4			139.1
	5, 9	7.10	(d, 7.3)	130.1
	6, 8	7.22	(t, 7.3)	129.7
	7	7.15	(t, 7.3)	127.6
	1			171.7
	2	4.47	(dd, 5.8, 8.6)	61.1
	3	2.01	(m)	31.4
		1.60	(m)	
	4	2.32	(m)	33.0
		2.21	(m)	
Hty	5			132.8
	6, 10	6.92	(d, 8.5)	130.0
	7, 9	6.67	(d, 8.5)	116.4
	8			157.1
	N-Me	1.89	(s)	28.3
	1			174.4
	2	4.67	(dd, 3.7, 10.7)	50.0
	3	2.07	(m)	34.6
		1.81	(m)	
	4	2.78	(m)	31.9
Ile		2.66	(m)	
	5			132.5
	6, 10	7.06	(d, 8.6)	130.8
	7, 9	6.70	(d, 8.6)	116.5
	8			157.5
	1			175.1
	2	4.06	(d, 9.2)	60.1
	3	1.92	(m)	37.5
	4	1.78	(m)	26.7
		1.28	(m)	
Lys	5	1.01	(t, 7.3)	12.0
	6	1.00	(d, 7.0)	16.3
	1			176.2
	2	4.12	(dd, 4.3, 5.5)	56.5
	3	1.95	(m)	32.5
		1.75	(m)	
Arg	4	1.55	(m)	21.8
		1.35	(m)	
	5	1.62	(m)	29.3
	6	3.70	(m)	40.2
		3.00	(m)	
	1			179.4
Arg	2	4.15	(dd, 6.4, 7.0)	55.5
	3	1.85	(m)	32.2
		1.67	(m)	
	4	1.65	(m)	26.0
	5	3.23	(m)	42.1
		3.18	(m)	
CO(ureido)	6			158.6
				159.7

## (4) Oscillamide H の構造解析

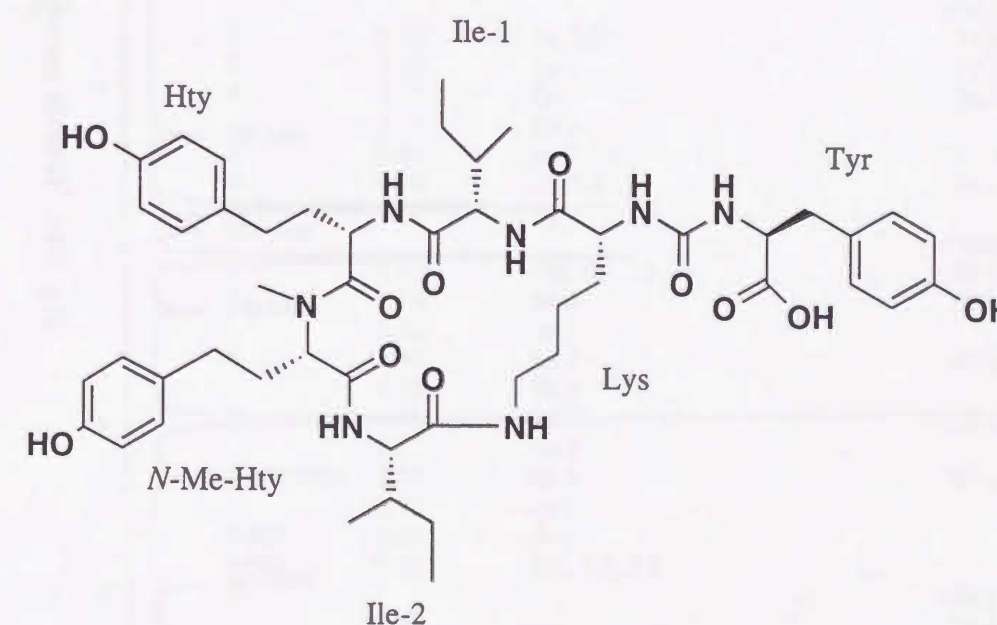
Oscillamide H (**13**) は無色の固体で、UV スペクトルにおける極大吸収は 279 nm であった。FABMS スペクトルでは、正イオンモードにおいて  $m/z$  930 に疑似分子イオンピークが観察された。高分解能 FABMS スペクトル ( $m/z$  930.4891,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) の結果から、**13** の分子式を  $\text{C}_{49}\text{H}_{66}\text{O}_{11}\text{N}_7$  (calcd for  $\text{C}_{49}\text{H}_{67}\text{O}_{11}\text{N}_7$ : 851.4779,  $\Delta$  -8.5 mmu) と決定した。

**13** はペプチド性の化合物であることがその  $^1\text{H}$ - および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルデータ (Table 5-5.) から示唆された。**13** を酸加水分解後 (6 M HCl, 150 °C, 10 hr)、構成アミノ酸を分析し、homotyrosine (Hty), tyrosine (Tyr), lysine (Lys), isoleucine (Ile), *N*-methylhomotyrosine (*N*-Me-Hty) の存在を確認した。また、Marfey 法および chiral な GC カラムを用いて分析を行い、Lys のみが D 型で、残りのアミノ酸は L 型の立体配置であると決定した。

**13** はそのアミノ酸組成および分子式から、oscillamide C (**12**) の Phe の位置が Ile に、Arg の位置が Tyr にそれぞれ置換された化合物であると推察された。

**13** の 2 次元 NMR スペクトルを詳細に検討し、 $^1\text{H}$ - (Fig. 5-16.) および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルのシグナルを帰属した。

これらの結果および HMBC, ROESY スペクトルの詳細な検討から、oscillamide H (**13**) の構造を Fig. 5-15. のように決定した。

Fig. 5-15. Structure of oscillamide H (**13**).

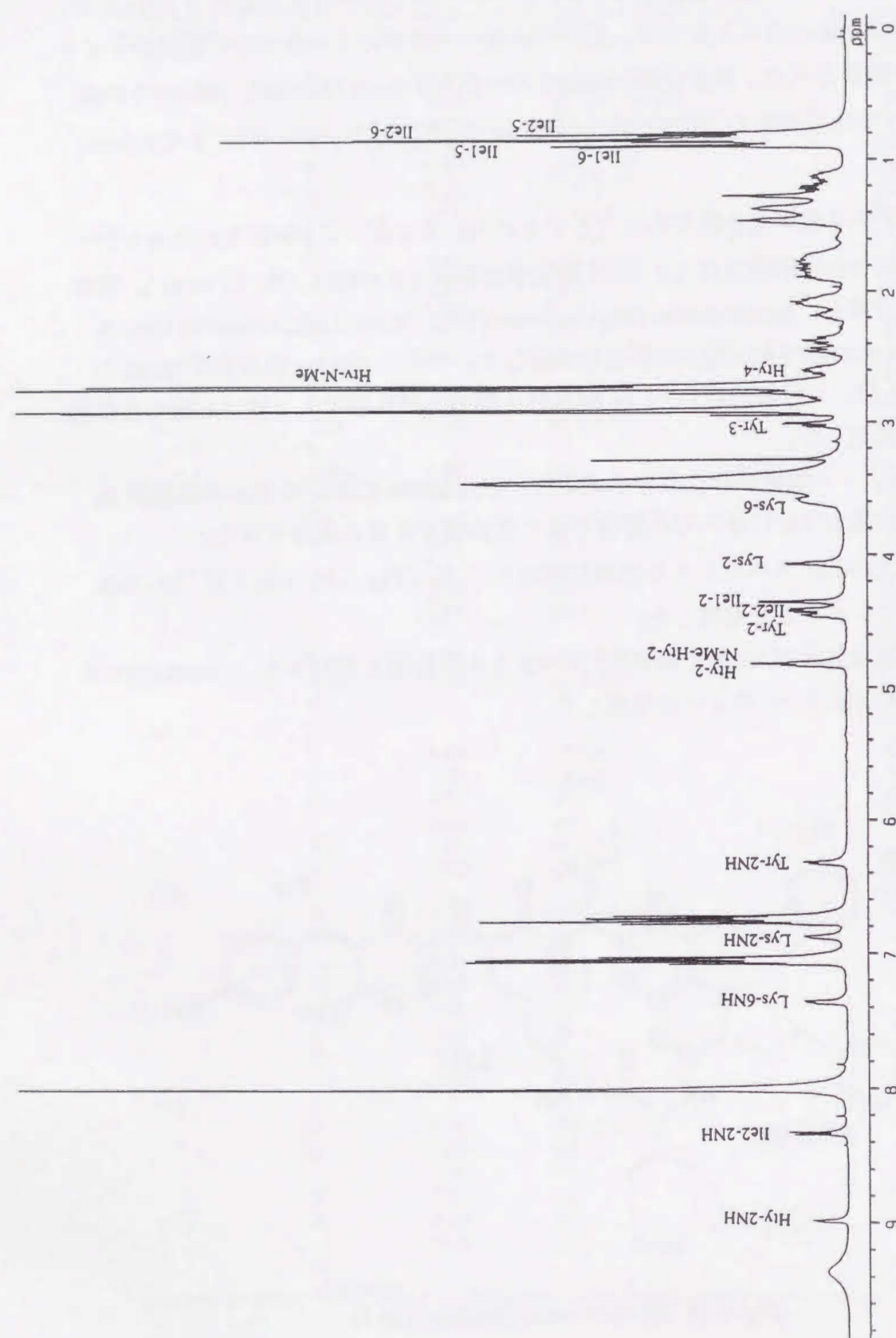


Fig. 5-16.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of **13** in dimethylformamide- $d_7$  (500 MHz).

Table 5-5.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for oscillamide H in dimethylformamide- $d_7$ .

Position		$^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$
Ile-2	1			171.6
	2	4.40	(dd, 4.0, 9.0)	58.9
	3	2.09	(m)	37.1
	4	1.38	(m)	21.6
		1.12	(m)	
	5	0.80	(t, 7.3)	11.9
	6	0.85	(d, 7.0)	16.4
	NH	8.34	(d, 9.0)	
N-Me-Hty	1			170.4
	2	4.81	(br)	60.4
	3	2.18	(m)	32.0
		1.79	(m)	
	4	2.46	(m)	32.5
		2.38	(m)	
	5			132.7
	6, 10	7.05	(d, 9.0)	129.7
	7, 9	6.75	(d, 9.0)	115.9
	8			156.7
Hty	N-Me	2.71	(s)	29.0
	1			173.3
	2	4.82	(m)	49.5
	3	2.05	(m)	32.2
		1.83	(m)	
	4	2.78	(m)	31.7
		2.59	(m)	
	5			132.1
	6, 10	7.07	(d, 8.8)	130.1
	7, 9	6.77	(d, 8.8)	115.9
Ile-1	8			156.9
	NH	8.99	(d, 5.2)	
	1			174.2
	2	4.35	(d, 5.5)	57.0
	3	1.89	(m)	37.3
	4	1.47	(m)	26.5
		1.19	(m)	
	5	0.86	(t, 7.3)	11.9
	6	0.90	(d, 7.0)	15.1
	NH	7.05	(br)	
Lys	1			173.5
	2	4.07	(dd, 6.2, 10.2)	56.1
	3	1.74	(m)	32.0
		1.72	(m)	
	4	1.46	(m)	29.0
		1.35	(m)	
	5	1.45	(m)	25.1
		1.37	(m)	
	6	3.59	(m)	38.9
		2.75	(m)	
Tyr	2-NH	6.88	(br)	
	6-NH	7.37	(dd, 4.3, 7.6)	
	1			174.5
	2	4.44	(m)	55.4
	3	3.02	(dd, 5.2, 13.7)	37.9
		2.94	(m)	
	4			128.7
	5, 9	7.03	(d, 8.5)	131.0
	6, 8	6.72	(d, 8.5)	115.6
	7			157.2
	NH	6.32	(d, 7.9)	
	CO(ureido)			158.3



#### 第4節 Oscillamide 類の生理活性

Oscillamide Y および B はキモトリプシンの活性を阻害し、その IC<sub>50</sub> はそれぞれ  $6 \times 10^{-6} M$ ,  $2 \times 10^{-5} M$  であった。

#### 第5節 考察

Oscillamide はウレイド結合を含み、1 個の *N*-Me アミノ酸と D-Lys を有するユニークな環状ペプチドである。また、**12** および **13** は *N*-Me-Hty を含んでいるが、この異常アミノ酸ユニットは、初めて発見されたものである。1995 年には Harada らにより藍藻 *Anabaena flos-aquae* から、oscillamide と類似の環状ペプチド anabaenopeptin A および B が単離された<sup>48)</sup>。それ以前には oscillamide と類似の構造のカルモジュリン拮抗作用を有する環状ペプチド konbamide<sup>49)</sup> および keramamide A<sup>50)</sup> が、Kobayashi らにより海綿 *Theonella* sp. から 1991 年に単離されている。構造の類似性から、konbamide および keramamide A は共生藍藻類が生産している可能性が高いと考えられる。

第6章 3-Amino-2-hydroxydecanoic acid を含む新規鎖状ペプチド Oscillagin A  
および B

第1節 Oscillagin A および B の単離

CT 培地 1120 L を用いて *Oscillatoria agardhii* (NIES-610 = CCAP 1459/22 = NIVA CYA 18) の通気培養を行い、連続遠心により藻体を集めた後、凍結乾燥を行い乾燥藻体 99.1 g を得た。得られた藻体を 8 L の  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 1 : 3 : 1$  に懸濁した後、遠心分離を行い、可溶性成分を抽出した。抽出液を減圧濃縮した後、5% 酢酸水溶液に懸濁し、不溶物を遠心分離で除いた。Sep Pak ODS カートリッジに遠心上清を吸着させ、20% MeOH でカートリッジを洗浄した後、90% MeOH で溶出した。90% MeOH 溶出画分を減圧乾固した後、20% MeOH に溶解し、逆相 HPLC (Ultron ODS, 20 x 250 mm; 55% MeOH、50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) で精製を行い oscillagin A (**14**、37.5 mg、乾燥重量の 0.04%) および oscillagin B (**15**、37.0 mg、乾燥重量の 0.04%) をそれぞれ単離した。

第2節 Oscillagin A の構造解析

Oscillagin A (**14**) は無色の固体で、UV スペクトルにおいて 279 nm に極大吸収を示した。FABMS スペクトル (Fig. 6-4.) では、正イオンモードにおいて  $m/z$  615 に疑似分子イオンピークが観察され、 $m/z$  617 にも約 3 分の 1 の強度で  $[\text{M}+\text{H}+2]^+$  のピークが観察された。このことから、**14** は分子内に 1 個の塩素原子を含んでいることが示唆された。両ピークの高分解能 FABMS スペクトル ( $m/z$  615.3126;  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、 $m/z$  617.3122;  $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ ) を解析することにより、**14** の分子式を  $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{O}_8\text{N}_4\text{Cl}$  (calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_8\text{N}_4^{35}\text{Cl}$ : 615.3160,  $\Delta$  -3.4 mmu, calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_8\text{N}_4^{37}\text{Cl}$ : 617.3131,  $\Delta$  -0.9 mmu) と決定した。

$^1\text{H}$ - および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルデータ (Table 6-1.) から **14** はペプチドであることが示唆されたため、酸加水分解後 (6 M HCl, 110 °C, 20 hr)、構成アミノ酸の分析を行い、homotyrosine (Hty), serine (Ser), *N*-methylvaline (*N*-Me-Val) の存在を確認した。また、アミノ酸の光学異性体の分析から、これらのアミノ酸は全て L 型であることを確認した。

$^1\text{H}$ -NMR スペクトル (Fig. 6-5.) において、上記アミノ酸のシグナルの他に、4.18 ppm と 3.35 ppm に broad なシグナルが観察され、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトル (Fig. 6-8.) において両シグナル間に相関ピークが観察された。また、HMBC スペクトル (Fig. 6-9.) において、4.18 ppm のシグナルと 172.9 ppm のカルボニル炭素との間に相関ピークが観察された。更に、3.62 ppm に triplet のメチレン水素のシグナルが観察され、このメチレンの炭素シグナルが HSQC スペクトル (Fig. 6-7.) において 45.9 ppm に観察された。これらの結果より、残りのユニットは  $\beta$  アミノ酸 3-amino-10-chloro-2-hydroxydecanoic acid (ClAhda) であることを確認した (Fig. 6-1.)。

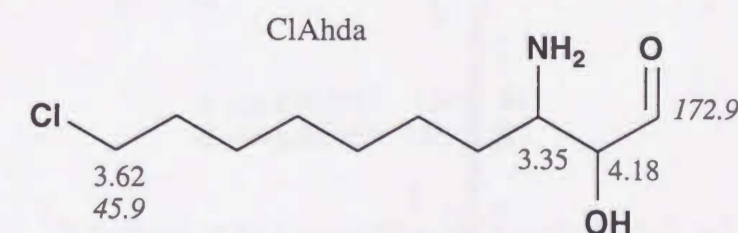


Fig. 6-1. Structure of 3-amino-10-chloro-2-hydroxydecanoic acid (ClAhda) unit.

ClAhda の  $^1\text{H}$ - および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルのデータが、microginin <sup>16)</sup> の Ahda のデータと非常に良く一致していることから、ClAhda の 2 位および 3 位の立体配座は microginin と同じ [2S,3R] である <sup>51), 52)</sup> と確認した。

これらのアミノ酸の配列は、HMBC スペクトルにおいて、 $\alpha$ -NH および *N*-Me と



カルボニル炭素と間の相関ピークにより確認した (Fig. 6-2.)。

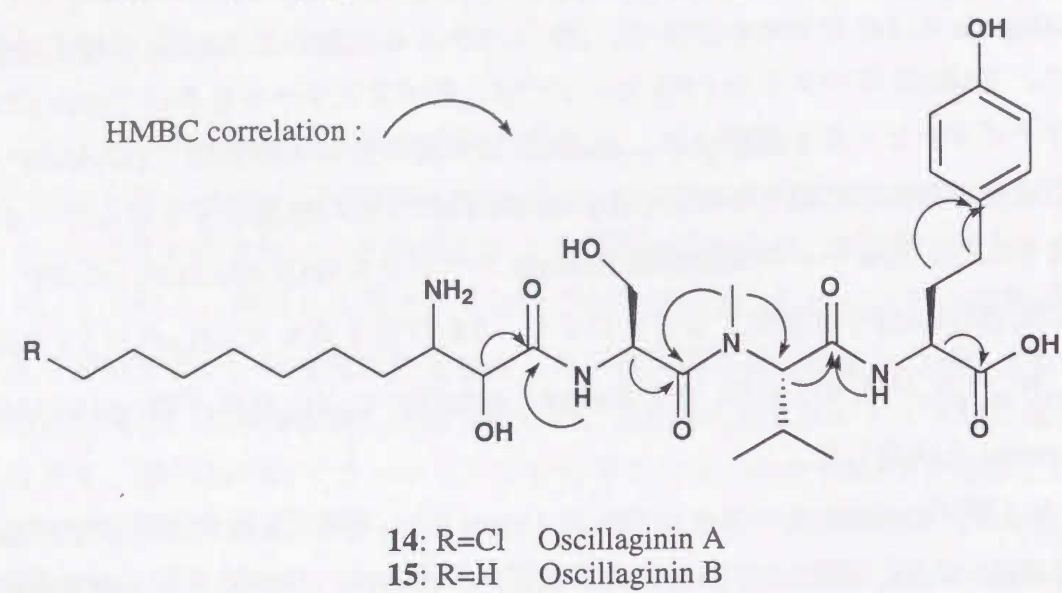


Fig. 6-2. HMBC correlations of **14** and **15**.

以上の結果より、oscillaginin A (**14**) の構造を Fig. 6-3. のように決定した<sup>53)</sup>。

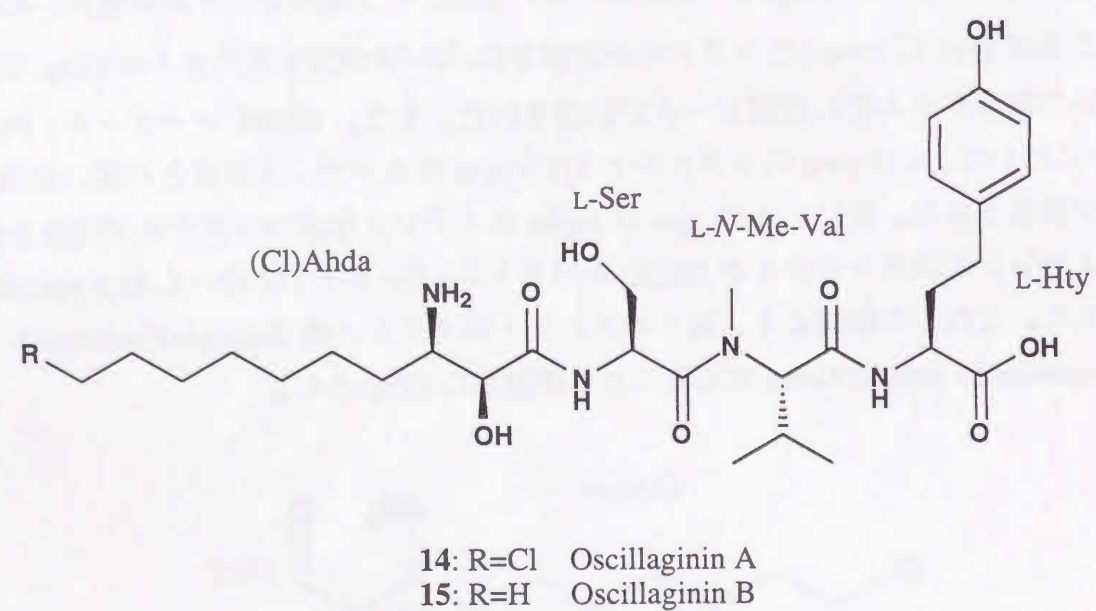


Fig. 6-3. Structures of oscillaginin A (**14**) and B (**15**).

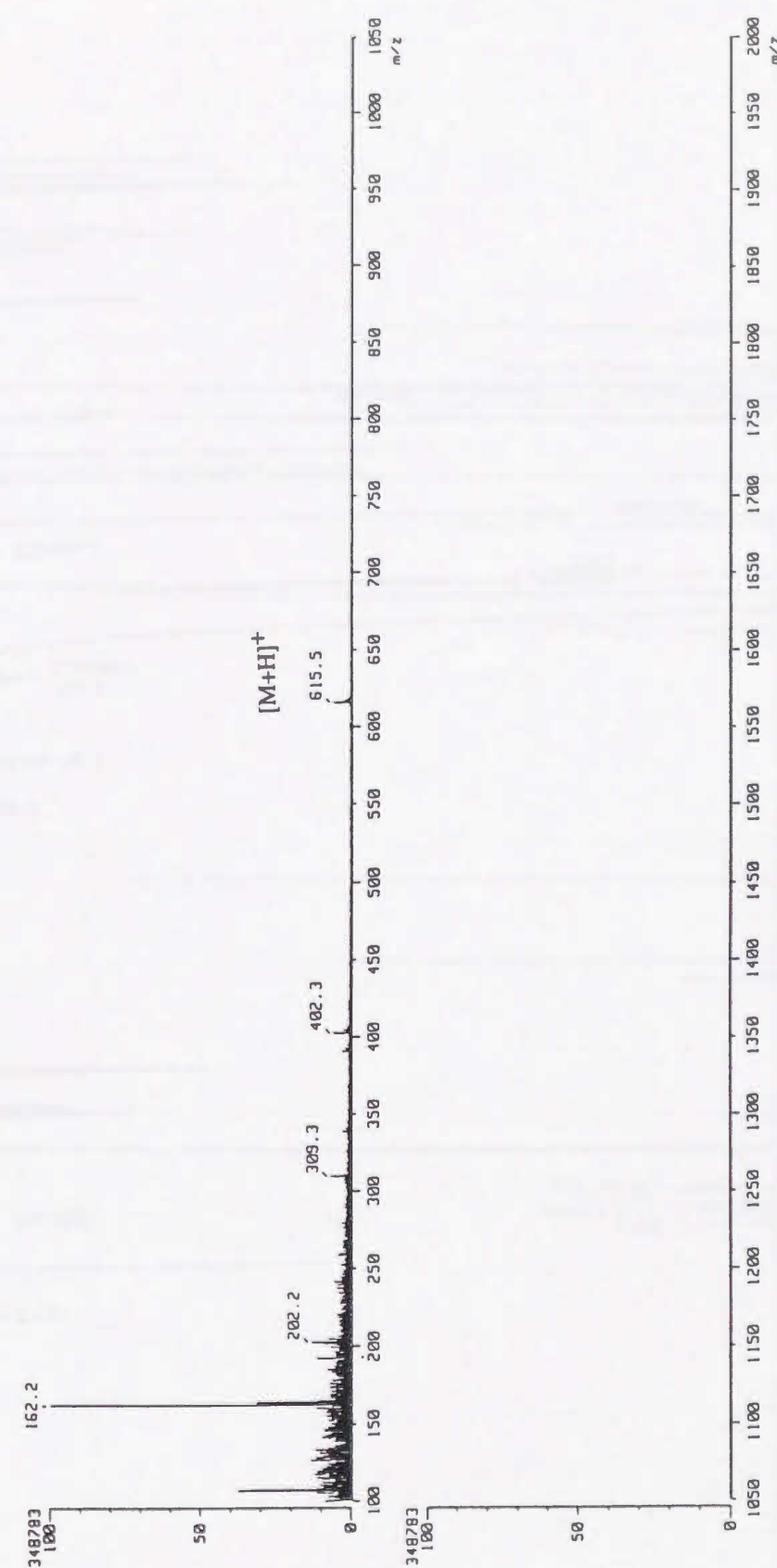


Fig. 6-4. Positive FAB/MS spectrum of **14** using glycerol as a matrix.

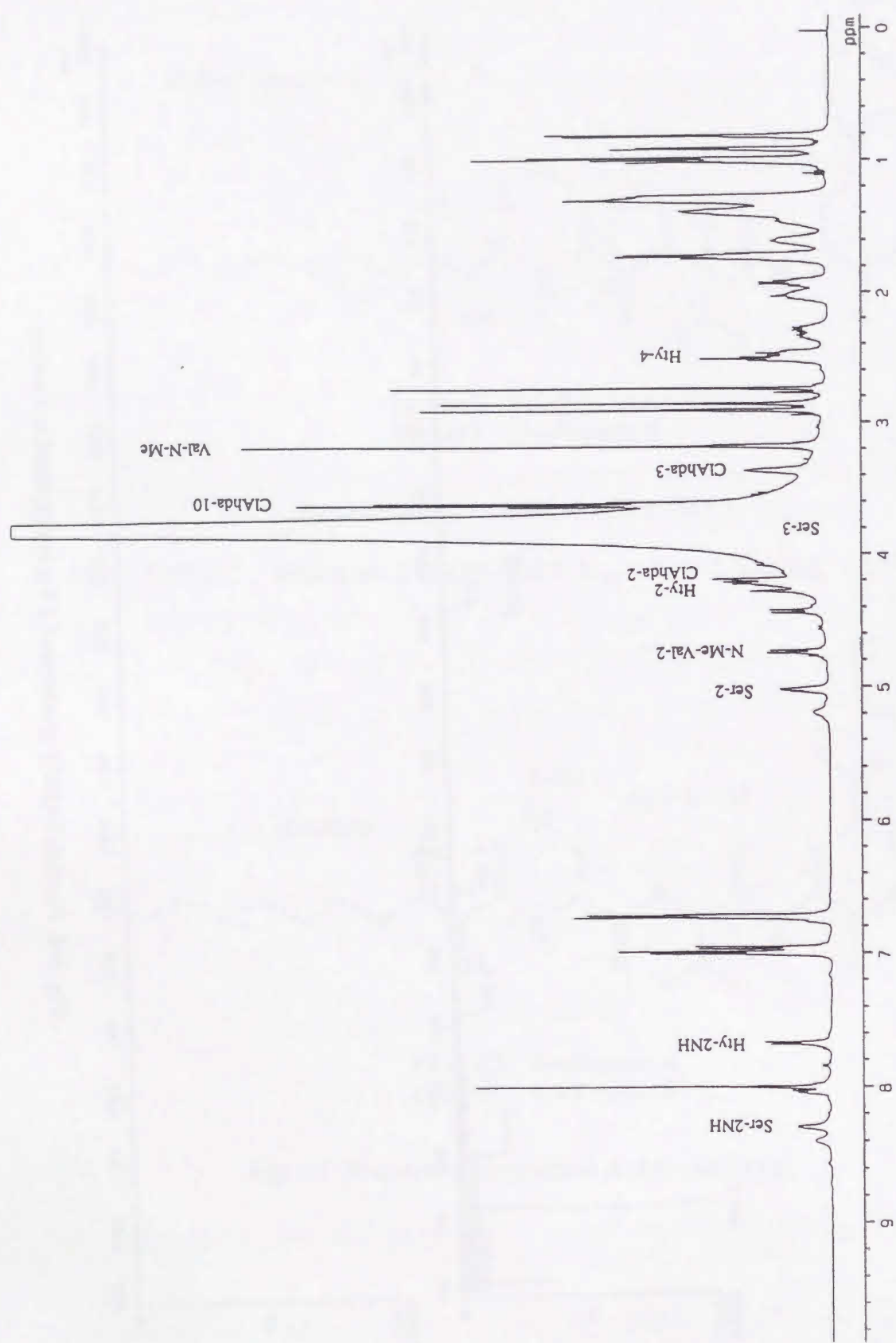


Fig. 6-5.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of **14** in dimethylformamide- $d_7$  (500 MHz).

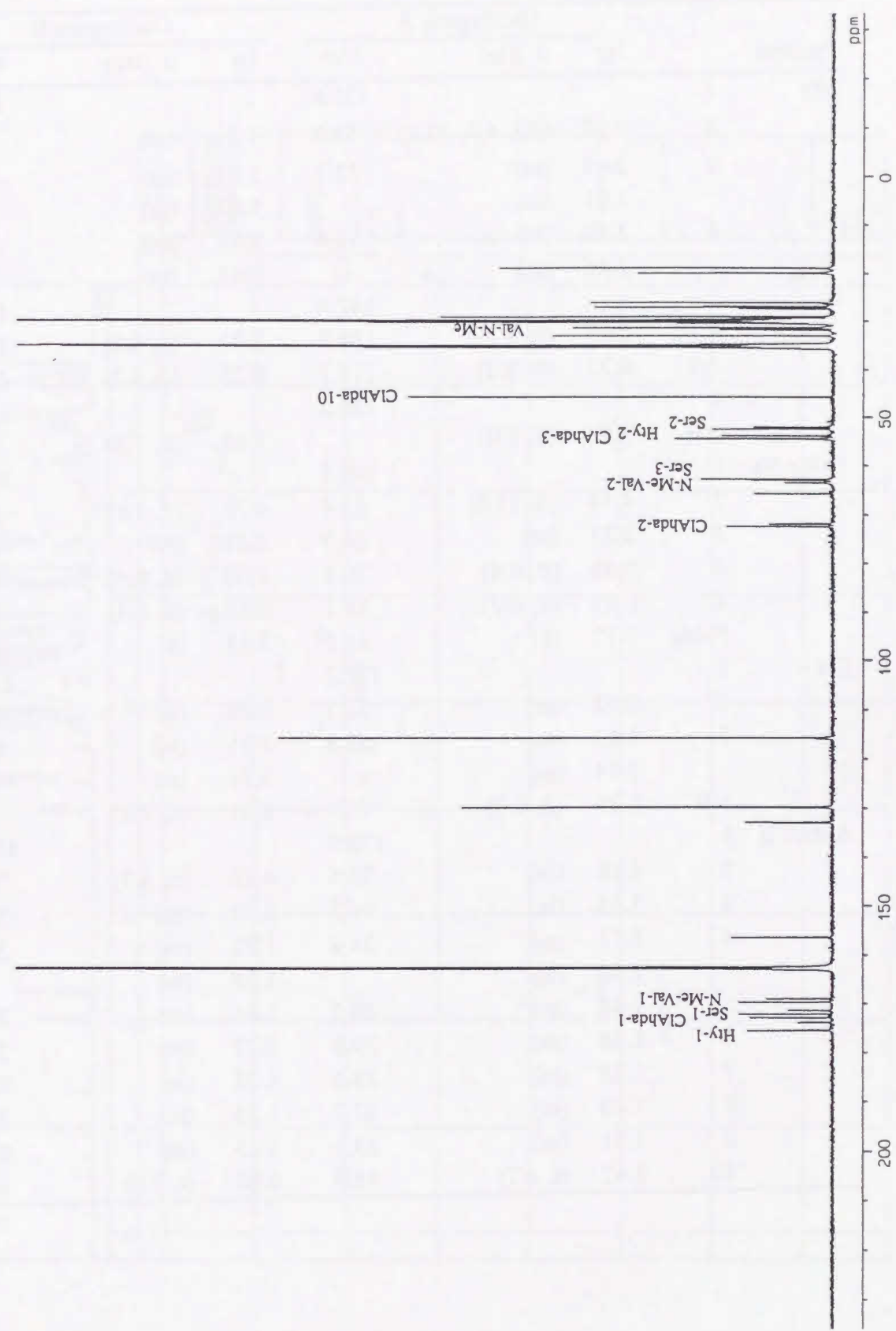


Fig. 6-6.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of **14** in dimethylformamide- $d_7$  (125 MHz).



Table 6-1.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for oscillagin A and B in dimethylformamide- $d_7$ .

Position	Oscillagin A			Oscillagin B		
	$^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$
Hty	1		175.6			175.5
	2	4.22 (dd, 4.9, 12.2)	53.9	4.21 (m)		54.5
	3	2.01 (m)	35.2	2.03 (m)		35.2
		1.91 (m)		1.92 (m)		
	4	2.50 (m)	31.4	2.52 (m)		31.5
		2.46 (m)		2.48 (m)		
	5		132.9			132.9
	6,10	6.99 (d, 8.2)	129.9	7.01 (d, 8.2)		129.9
	7,9	6.72 (d, 8.2)	115.7	6.73 (d, 8.2)		115.7
	8		156.5			156.6
N-Me-Val	NH	7.67 (d, 7.0)		7.68 (d, 7.3)		
	1		169.7			169.8
	2	4.74 (d, 11.0)	63.4	4.76 (d, 10.7)		63.5
	3	2.27 (m)	26.9	2.28 (m)		26.9
	4	0.98 (d, 6.4)	20.1	1.00 (d, 6.4)		20.2
	4'	0.81 (d, 6.7)	19.1	0.82 (d, 6.4)		19.1
Ser	N-Me	3.17 (s)	31.5	3.18 (s)		31.4
	1		172.2			172.2
	2	5.02 (m)	52.5	5.03 (m)		52.5
	3	3.83 (m)	62.8	3.85 (m)		62.9
Ahda(Cl)		3.74 (m)		3.75 (m)		
	NH	8.29 (d, 8.0)		8.31 (d, 7.3)		
	1		172.9			173.0
	2	4.18 (br)	72.5	4.16 (d, 3.7)		72.7
	3	3.35 (br)	54.5	3.33 (m)		54.6
	4	1.71 (m)	31.9	1.72 (m)		32.2
		1.60 (m)		1.58 (m)		
	5	1.46 (m)	26.1	1.46 (m)		26.3
	6	1.28 (m)	29.9	1.27 (m)		29.9
	7	1.28 (m)	29.1	1.25 (m)		23.0
	8	1.40 (m)	27.2	1.25 (m)		23.0
	9	1.71 (m)	33.1	1.25 (m)		29.2
	10	3.62 (t, 6.7)	45.9	0.86 (t, 7.0)		14.2

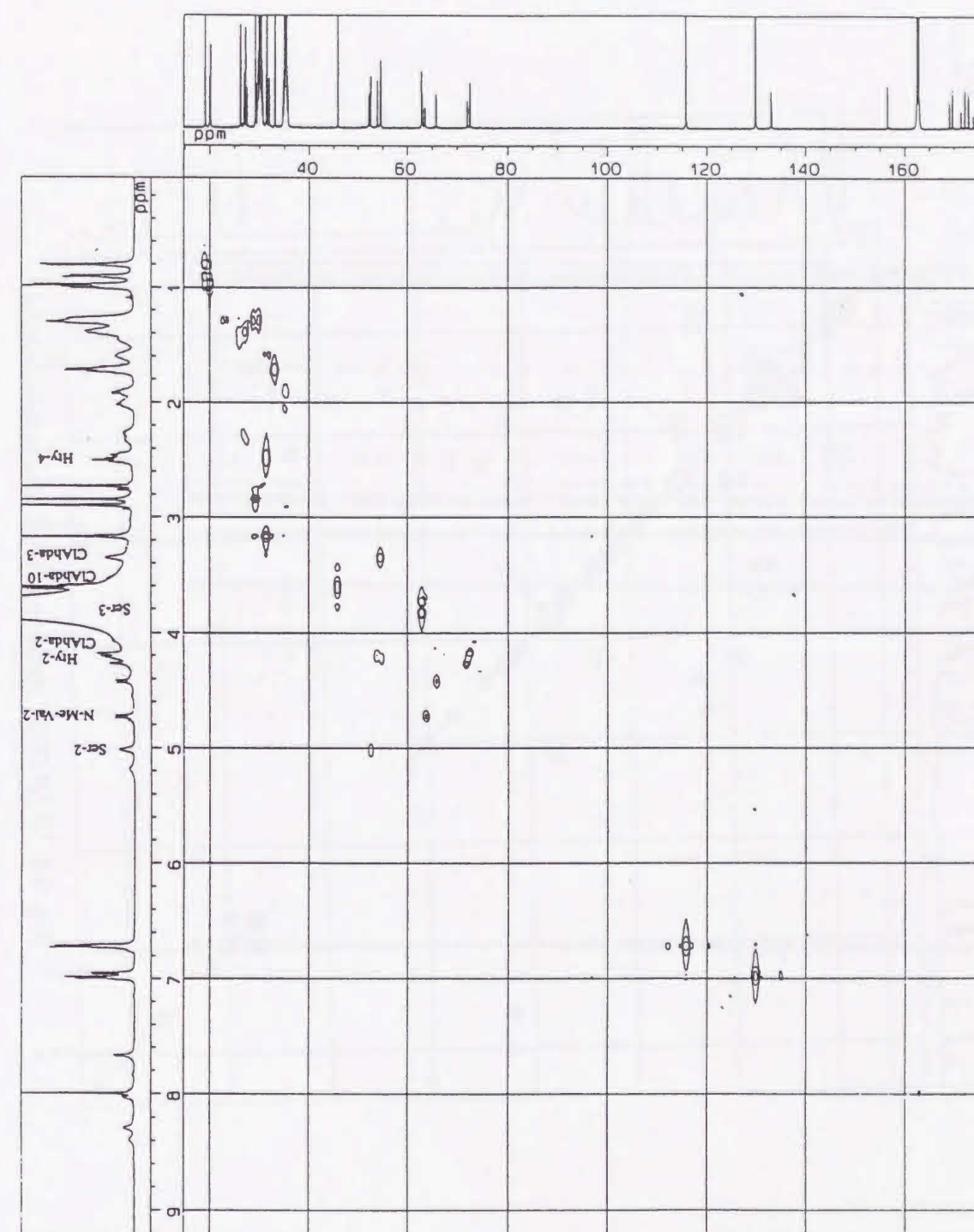


Fig. 6-7.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spectrum of 14 in dimethylformamide- $d_7$ .

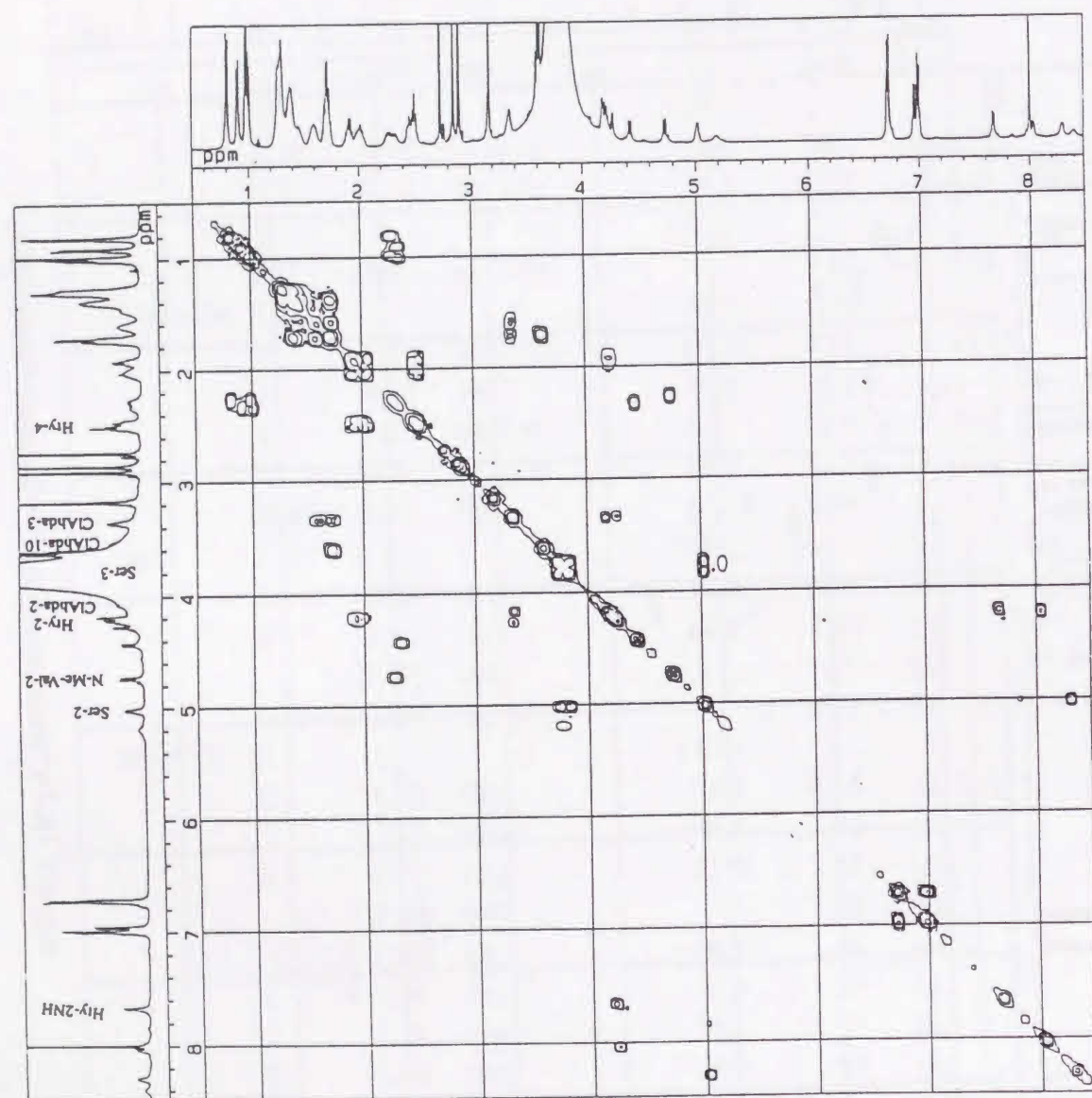


Fig. 6-8.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum of 14 in dimethylformamide- $d_7$ .

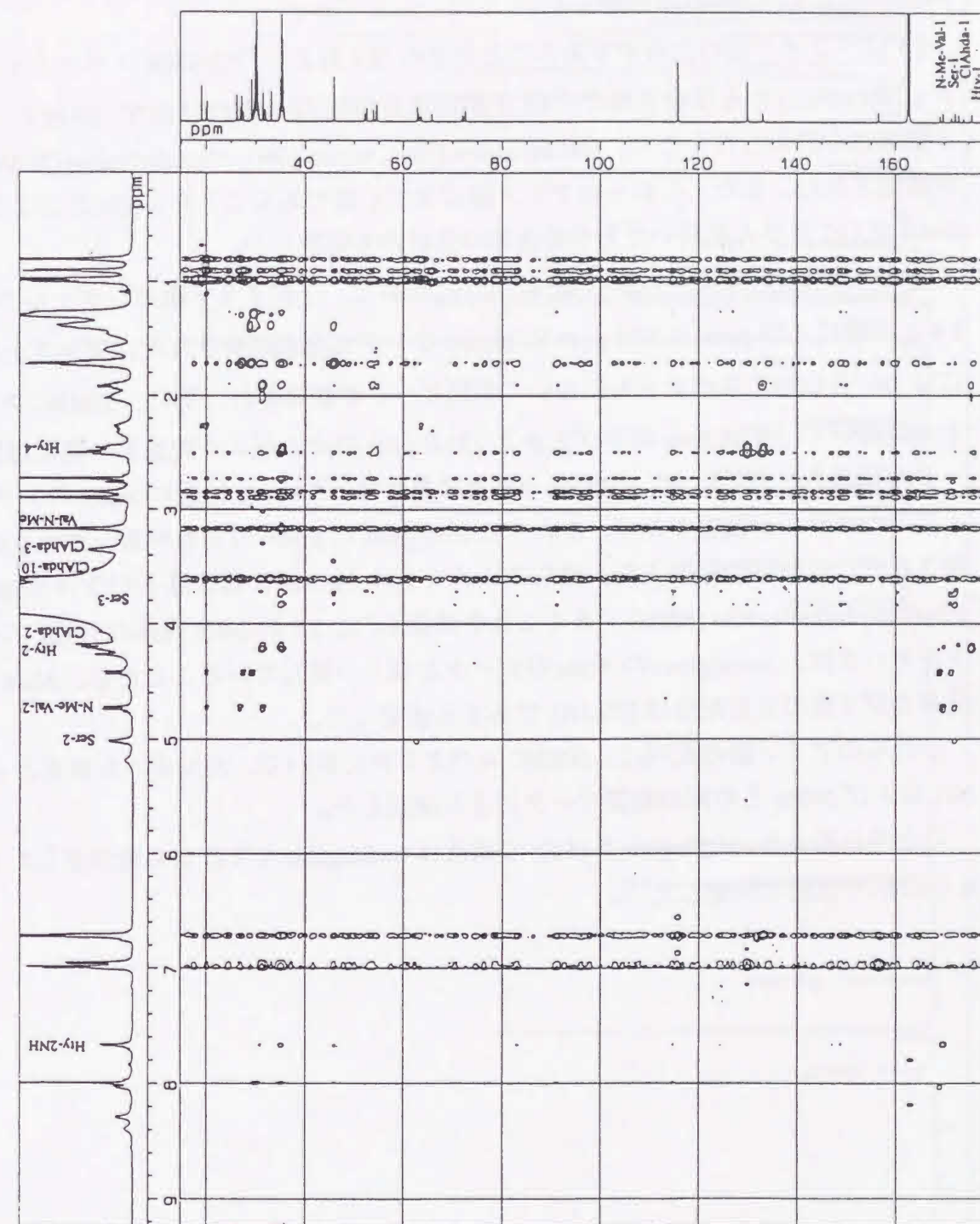


Fig. 6-9.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBBC spectrum of 14 in dimethylformamide- $d_7$ .



### 第3節 Oscillaginin B の構造解析

Oscillaginin B (**15**) は無色の固体で、正イオンモードの FABMS スペクトルでは、疑似分子イオンピークが  $m/z$  581 に観察された。高分解能 FABMS スペクトル ( $m/z$  581.3586;  $[M+H]^+$ ) の解析により、分子式を  $C_{29}H_{48}O_8N_4$  (calcd for  $C_{29}H_{49}O_8N_4$ : 581.3550,  $\Delta +3.6$  mmu) と決定した。

**15** はペプチド性の化合物であることがその  $^1H$ - および  $^{13}C$ -NMR スペクトルデータ (Table 6-1.) から示唆された。**15** を酸加水分解後 (6 M HCl, 110 °C, 20 hr)、アミノ酸組成を分析したところ、homotyrosine (Hty), serine (Ser), *N*-methylvaline (*N*-Me-Val) が確認された。また、これらのアミノ酸は全て L 型であることを、HPLC および chiral な GC カラムを用いた光学異性体の分析から確認した。

**15** の  $^1H$ -NMR スペクトル (Fig. 6-10.) において、上記アミノ酸のシグナルの他に、**14** と同様に 4.16 ppm と 3.33 ppm に broad なシグナルが観察された。両シグナル間には  $^1H$ - $^1H$  COSY スペクトルにおいて相関ピークが観察され、更に、HMBC スペクトルにおいて、4.16 ppm のシグナルと 173.0 ppm のカルボニル炭素との間に相関ピークが観察された。しかしながら、**14** とは異なり、3.6 ppm 付近に triplet のメチレン水素のシグナルが観察されず、かわりに 0.86 ppm に triplet のメチル基シグナルが観察された。これらの結果より、残りのユニットは ClAhda の塩素原子がない 3-amino-2-hydroxydecanoic acid (Ahda) であることを確認した。**15** の Ahda 残基の NMR スペクトルデータは、microginin の Ahda のデータと良く一致していることから、Ahda の 2 位および 3 位の立体配座は [2*S*,3*R*] であると決定した。

これらのアミノ酸の配列は、HMBC スペクトルにおいて、カルボニル炭素と  $\alpha$ -NH および *N*-Me との間の相関ピークにより確認した。

以上の結果より、oscillaginin B (**15**) の構造は oscillaginin A (**14**) から脱塩素した Fig. 6-3. に示す構造と決定した<sup>53)</sup>。

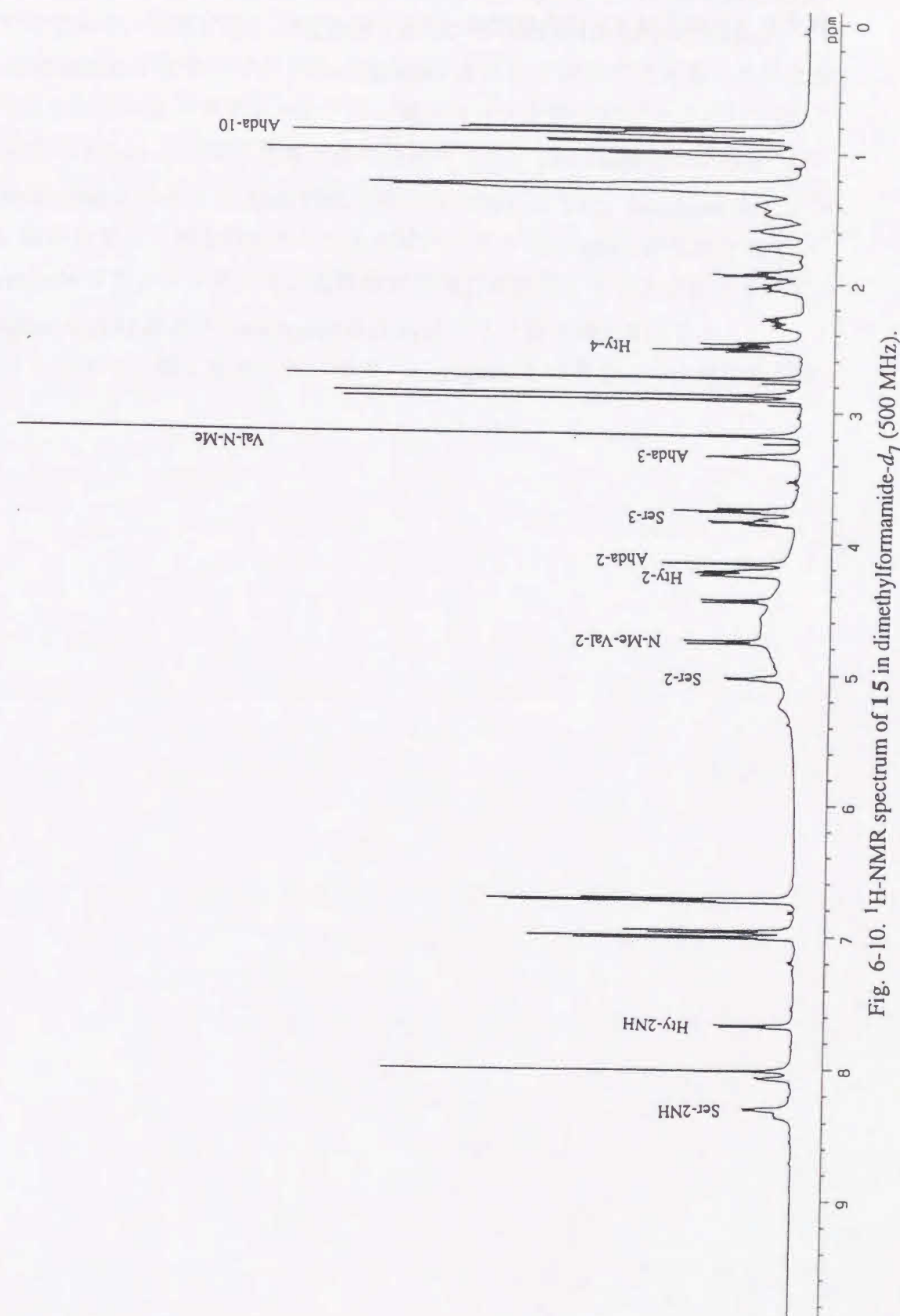


Fig. 6-10.  $^1H$ -NMR spectrum of **15** in dimethylformamide- $d_7$  (500 MHz).

#### 第4節 Oscillagin A および B の生理活性

Oscillagin A および B はキモトリプシンの活性を弱いながらも阻害し、IC<sub>50</sub> はそれぞれ  $3 \times 10^{-5} M$ ,  $5 \times 10^{-5} M$  であった。

#### 第5節 考察

Oscillagin A (14) は淡水産藍藻から単離した化合物であるにも関わらず塩素の入ったペプチドであり、非常に珍しい化合物である。3-Amino-10-chloro-2-hydroxy-decanoic acid (ClAhda) を含むペプチドは oscillagin A (14) が初めてである。このほかに、塩素の入った2-ヒドロキシ-βアミノ酸ユニットを持つペプチドとしては、*Anabaena* 属から Moore らにより単離された環状ペプチド puwainaphytin がある<sup>54)</sup>。

また、oscillagin B のように Ahda 残基を持つ化合物としては、Murakami らにより *Microcystis* 属からアミノ酸5残基からなる鎖状ペプチド microginin が単離されている<sup>16)</sup>。Microginin はアンジオテンシン変換酵素を強力に阻害することが報告されている。Oscillagin A (14) および oscillagin B (15) はアミノ酸4残基からなり、microginin よりもアミノ酸1残基小さいので、microginin とは異なった生理活性が期待される。



藍藻は原核生物でありながら光合成をする興味深い生物である。一方で、藍藻は富栄養化した湖沼などでは異常増殖をおこし、ときに有毒アオコとなるなどして世界中で問題となっている。

しかしながら、天然物資源として見た場合、藍藻は淡水湖沼、汽水域、海洋、土壌など様々な環境下で生育しており、培養が比較的容易なため、医薬品リード化合物の新たな資源として注目されている。

本研究は、糸状藍藻 *Oscillatoria agardhii* が生産する生理活性ペプチドに関するものであり、以下に得られた知見をまとめた。

- 1) *O. agardhii* が生産する肝臓毒 microcystin を単離し、その構造を解析した結果、MS とアミノ酸分析では既存の microcystin と区別がつかない Dhb-microcystin であることを明らかにした。この Dhb-microcystin の構造を決定する際に、HMBC よりも微弱な結合を測定可能な decoupled-HMBC 法が有効であった。この Dhb-microcystin の発見により、microcystin の分析法に重大な影響を与えた。
- 2) トリプトファンの分子内環化反応とイソプレレンユニットの付加反応によって合成されたと考えられる新規異常アミノ酸 (3a-cis)-1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-3a-(3-methyl-2-butenyl)-pyrrolo[2,3-b]indol-2-carboxylic acid (oscillatoric acid) ユニットを含む環状ペプチド oscillatorin を単離し、その構造を決定した。Oscillatorin はキモトリプシンを強力に阻害した。
- 3) 3-Amino-6-hydroxy-2-piperidone (Ahp) 残基を含む新規環状ペプチド oscillapeptin A ~C、G の構造を決定した。Oscillapeptins はトリプシンあるいはキモトリプシンの活性を nM レベルで阻害し、強力な阻害物質であることを明らかにした。また、その構造と阻害酵素特異性に関して新たな知見を得た。
- 4) ウレイド結合を有し、homotyrosine および N-Me アミノ酸を含む環状ペプチド oscillamide A ~C, H, Y を単離した。Oscillamide B および Y はキモトリプシンを阻害した。
- 5) 淡水産の藍藻から塩素で置換された 3-amino-10-chloro-2-hydroxydecanoic acid (ClAhda) を含む新規鎖状ペプチド oscillaginin A およびその脱塩素体 oscillaginin B を単離し、その構造を決定した。Oscillaginin A および B はキモトリプシンを阻害した。

本研究で *Oscillatoria agardhii* から得られたペプチドの中で、特に oscillapeptin A, B, C および G のキモトリプシンおよびトリプシン阻害活性は強力で、有用な化合物となりうると思われる。また、*Oscillatoria agardhii* から得られたペプチドは異常アミノ酸として homotyrosine を含むことが多く、tyrosine 代謝関連酵素との相互作用に興味をもたれる。さらに、oscillatoric acid, Ahp, ClAhda などの異常アミノ酸も含まれており、他の新しい生理活性の発見が望まれる。

環状ペプチドとしては、gramicidin S や bacitracin などの抗生物質が有名であるが、本研究で用いた *Oscillatoria agardhii* は環状ペプチドの宝庫ともいえるもので、Dhb-microcystin 以外は同じ構造の化合物が見つからないほど株によって生産しているペプチドの構造がそれぞれ異なり、医薬品リード化合物の資源としても有用であることが確認された。



### 一般的方法

比旋光度の測定はアタゴ社製 POLAX-D を使用した。紫外吸収スペクトルは島津製作所製 UV-160 型旋光度計を用いて測定した。赤外吸収スペクトルは島津製作所製 FTIR-8100M 型赤外分光光度計を使用した。NMR スペクトルは日本電子株式会社製 JNM-A500 型核磁気共鳴装置により測定した。内部標準として溶媒のシグナル ( $^1\text{H}$ -NMR:  $\text{CD}_3\text{OD}$   $\delta$  3.30;  $\text{DMSO}-d_6$   $\delta$  2.49; dimethylformamide- $d_7$   $\delta$  2.74.  $^{13}\text{C}$ -NMR:  $\text{CD}_3\text{OD}$   $\delta$  49.0;  $\text{DMSO}-d_6$   $\delta$  39.5; dimethylformamide- $d_7$   $\delta$  30.1.) を用い、化学シフトは  $\delta$  値で、スピン結合定数は  $J$  値で示し、開裂様式は、s=singlet、d=doublet、t=triplet、q=quartet、dd=double doublet、br=broad とそれぞれ略した。マススペクトルは日本電子株式会社製 JMS-700 型質量分析計を用い、FABMS のマトリックスには glycerol を使用した。

高速液体クロマトグラフィーは、島津製作所製 LC-6A、LC-8A、LC-10A 送液システムと SPD-6A UV 検出器および SPD-M6A、SPD-M10A フォトダイオードアレイ検出器を使用した。

薄層クロマトグラフィーには Merck 社製 HPTLC プレート Silica gel 60 F254 を使用し、展開後、UV ランプ (主波長 254 nm) によりスポットを検出した。

### アミノ酸分析

得られたペプチド化合物約 100  $\mu\text{g}$  を 200  $\mu\text{L}$  の 6 M HCl 中、110  $^{\circ}\text{C}$  で 20 時間加熱し、酸加水分解を行った (ただし、oscillamide は 150  $^{\circ}\text{C}$  で 10 時間)。加水分解されたサンプルを 2 つに分け、窒素気流下で乾固した。

#### (1) GC/MS による分析

乾固したサンプルに 3 M HCl を含む iPrOH 溶液を 400  $\mu\text{L}$  加えて 110  $^{\circ}\text{C}$  で 30 分加熱した。窒素気流下で乾固した後、100  $\mu\text{L}$  のトリフロロ酢酸無水物と 100  $\mu\text{L}$  のジクロロメタンを加え 110  $^{\circ}\text{C}$  で 5 分間加熱した。この反応液を窒素気流下で乾固し、GC/MS の試料とした。測定直前にジクロロメタンに溶解しただけに GC にインジェクトした。カラムは Chilasil L-Val capillary column (CHROMPACK、0.25 mm x 25 m) を用いて、40  $^{\circ}\text{C}$  で 1 分間保持した後、200  $^{\circ}\text{C}$  まで 8  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で昇温した。

#### (2) HPLC による分析

HPLC による分析は Marfey らの方法に準じて行った。

乾固したサンプルに  $\text{H}_2\text{O}$  50  $\mu\text{L}$  を加え溶解した。N $\alpha$ -(2,4-Dinitro-5-fluorophenyl)-L-

alaninamide (FDAA) の 0.1 % アセトン溶液を 100  $\mu\text{L}$  加えた後、1 M NaHCO<sub>3</sub> 20  $\mu\text{L}$  を加え 40  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間加温した。室温まで冷却した後、2 M HCl 10  $\mu\text{L}$  を加え窒素気流下で乾固した。200  $\mu\text{L}$  の DMSO に溶解し 200  $\mu\text{L}$  の  $\text{H}_2\text{O}$  を加えて HPLC の試料とした。

カラムは Mightysil ODS (関東化学、4.6 x 150 mm) を使用し、流速は 2 mL/min、50 mM リン酸緩衝液 (pH 3.0) 中で、アセトニトリル 15 % から 45 % の linear gradient (1 時間) により分析した。

### 酵素阻害実験

#### (1) トリプシン阻害活性

3 mL の 50 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) 中、0.5  $\mu\text{g}$  のトリプシン (Sigma, T-0134) が  $2 \times 10^{-5}$  M の N-Benzoylarginine ethyl ester (BAEE) を加水分解する速度を 253 nm の吸光度変化により測定した。測定は室温 (約 25  $^{\circ}\text{C}$ ) で行い、BAEE を加えた後、10 秒後から 30 秒間の吸光度変化率で阻害活性を求めた。

#### (2) キモトリプシン阻害活性

3 mL の 10 mM CaCl<sub>2</sub>、50 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) 中、0.25  $\mu\text{g}$  の  $\alpha$ -キモトリプシン (Sigma, C-4129) が  $2 \times 10^{-5}$  M の N-Benzoyltyrosine ethyl ester (BTEE) を加水分解する速度を 253 nm の吸光度変化により測定した。測定は室温 (約 25  $^{\circ}\text{C}$ ) で行い、BTEE を加えた後、10 秒後から 30 秒間の吸光度変化率で阻害活性を求めた。

## 第 2 章の実験の部

### *Oscillatoria agardhii* (NIES-610 = CCAP 1459/22 = NIVA CYA 18) の培養

*Oscillatoria agardhii* (NIES-610 = CCAP 1459/22 = NIVA CYA 18) を 10 L の培養瓶を用いて CT 培地中で通気培養を行った (温度 20  $^{\circ}\text{C}$ ; 照度 250  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 通気速度 1.5 L min<sup>-1</sup>)。藻体は連続遠心分離により収集し、凍結乾燥を行い乾燥藻体とした。1120 L の培地から乾燥藻体 99.1 g を得た。

### *Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/14) の培養

*Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/14) を 10 L の培養瓶を用いて CT 培地中で通気培養を行った (温度 20  $^{\circ}\text{C}$ ; 照度 250  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 通気速度 1.5 L min<sup>-1</sup>)。藻体は連続遠心分離により収集し、凍結乾燥を行い乾燥藻体とした。80 L の培地から



乾燥藻体 7.7 g を得た。

#### Dhb-microcystin-RR の単離

凍結乾燥した *Oscillatoria agardhii* (NIES-610) 99.1 g から 8 L の  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 1 : 3 : 1$  を用いて可溶性成分を抽出した。抽出液を減圧乾固後、抽出物を 5 % 酢酸水溶液 1.5 L に懸濁した。不溶物を遠心分離 (3500 x g、10 min) で除いた後、Sep Pak ODS カートリッジに吸着させた。カートリッジを 20 % MeOH で洗浄した後、90 % MeOH で溶出した。90 % MeOH 溶出画分を減圧乾固した後、溶出物を 20 % MeOH に溶解し逆相 HPLC (Ultron ODS, 20 x 250 mm; 流速 15 mL/min; 測定波長 239 nm; 溶出液 55 % MeOH、50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) および順相 HPTLC (Silica gel 60 F254, 0.25 mm; 展開溶媒  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 60 : 40 : 10$ ) で精製することにより Dhb-microcystin-RR (1、tR 12.4 min、Rf 0.4、7.54 mg、乾燥重量の 0.008 %) を単離した。

#### Dhb-microcystin-HtyR および LR の単離

乾燥した *Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/14) 7.7 g から MeOH 400 mL を用いて可溶性成分を抽出した。抽出液を減圧乾固後、抽出物を 5 % 酢酸水溶液 400 mL に懸濁した。不溶物を遠心分離 (3500 x g、10 min) で除いた後、Sep Pak ODS カートリッジに吸着させた。カートリッジを 20 % MeOH で洗浄した後、90 % MeOH で溶出した。90 % MeOH 溶出画分を減圧乾固した後、溶出物を 20 % MeOH に溶解し逆相 HPLC (Mightysil ODS, 20 x 250 mm; 流速 9 mL/min; 測定波長 239 nm; 溶出液 65 % MeOH、50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) および順相 HPTLC (Silica gel 60 F254, 0.25 mm; 展開溶媒  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 60 : 40 : 10$ ) で精製することにより Dhb-microcystin-HtyR (2、tR 11.7 min、Rf 0.5、12.1 mg、乾燥重量の 0.2 %) および Dhb-microcystin-LR (3、tR 14.0 min、Rf 0.5、9.4 mg、乾燥重量の 0.1 %) をそれぞれ単離した。

#### Dhb-microcystin-RR (1)

無色固体

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$	-67° (c 0.3, MeOH)
UV (H <sub>2</sub> O)	$\lambda$ max 239 nm (log $\epsilon$ 4.5)
FABMS (pos., glycerol)	$m/z$ 1024 (M+H) <sup>+</sup>
HRFABMS (pos., glycerol)	found: $m/z$ 1024.5608 (M+H) <sup>+</sup> calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{O}_{12}\text{N}_{13}$ : 1024.5580, $\Delta$ +2.8 mmu

#### <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR

Table 2-1.

#### Dhb-microcystin-HtyR (2)

無色固体

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$	-100° (c 0.2, MeOH)
UV (MeOH)	$\lambda$ max 239 nm (log $\epsilon$ 4.5)
FABMS (pos., glycerol)	$m/z$ 1045 (M+H) <sup>+</sup>
HRFABMS (pos., glycerol)	found: $m/z$ 1045.5359 (M+H) <sup>+</sup> calcd for $\text{C}_{52}\text{H}_{74}\text{O}_{13}\text{N}_{10}$ : 1045.5359, $\Delta$ +0.0 mmu

#### <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR

Table 2-2.

#### Dhb-microcystin-LR (3)

無色固体

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$	-133° (c 0.15, MeOH)
UV (MeOH)	$\lambda$ max 239 nm (log $\epsilon$ 4.5)
FABMS (pos., glycerol)	$m/z$ 981 (M+H) <sup>+</sup>
HRFABMS (pos., glycerol)	found: $m/z$ 981.5444 (M+H) <sup>+</sup> calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{O}_{12}\text{N}_{10}$ : 981.5410, $\Delta$ +3.4 mmu

#### <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR

Table 2-3.

#### 第 3 章の実験の部

#### *Oscillatoria agardhii* (NIES-610 = CCAP 1459/22 = NIVA CYA 18) の培養

*Oscillatoria agardhii* (NIES-610 = CCAP 1459/22 = NIVA CYA 18) を 10 L の培養瓶を用いて CT 培地中で通気培養を行った (温度 20 °C; 照度 250  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 通気速度 1.5 L min<sup>-1</sup>)。藻体は連続遠心分離により収集し、凍結乾燥を行い乾燥藻体とした。1120 L の培地から乾燥藻体 99.1 g を得た。

#### Oscillatorin の単離

乾燥した *Oscillatoria agardhii* (NIES-610) 99.1 g から 8 L の  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 1 : 3 : 1$  を用いて可溶性成分を抽出した。抽出液を減圧乾固後、抽出物を 5 % 酢酸水溶



液 1.5 L に懸濁した。不溶物を遠心分離 (3500 x g, 10 min) で除いた後、Sep Pak ODS カートリッジに吸着させた。カートリッジを 20 % MeOH で洗浄した後、90 % MeOH で溶出した。90 % MeOH 溶出画分を減圧乾固した後、溶出物を 20 % MeOH に溶解し逆相 HPLC (Purosphere ODS, 20 x 250 mm; 流速 6 mL/min; 測定波長 239 nm; 溶出液 75 % MeOH、50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) で精製することにより oscillatorin (4, tR 20.5 min、8.5 mg、乾燥重量の 0.009 %) を単離した。

#### Oscillatorin (4)

無色固体

$[\alpha]_D^{30}$  -57° (c 0.09, MeOH)

UV (MeOH)  $\lambda$  max 283 nm (log  $\epsilon$  3.4)

FABMS (pos., glycerol) m/z 1240 (M+H)<sup>+</sup>

HRFABMS (pos., glycerol) found: m/z 1240.6456 (M+H)<sup>+</sup>  
calcd for C<sub>60</sub>H<sub>86</sub>O<sub>14</sub>N<sub>15</sub>: 1240.6478,  $\Delta$  -2.2 mmu

<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR Table 3-1.

#### 第 4 章の実験の部

#### *Oscillatoria agardhii* (NIES-610 = CCAP 1459/22 = NIVA CYA 18) の培養

*Oscillatoria agardhii* (NIES-610 = CCAP 1459/22 = NIVA CYA 18) を 10 L の培養瓶を用いて CT 培地中で通気培養を行った (温度 20 °C; 照度 250  $\mu$  mol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; 通気速度 1.5 L min<sup>-1</sup>)。藻体は連続遠心分離により収集し、凍結乾燥を行い乾燥藻体とした。1120 L の培地から乾燥藻体 99.1 g を得た。

#### *Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/14) の培養

*Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/14) を 10 L の培養瓶を用いて CT 培地中で通気培養を行った (温度 20 °C; 照度 250  $\mu$  mol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; 通気速度 1.5 L min<sup>-1</sup>)。藻体は連続遠心分離により収集し、凍結乾燥を行い乾燥藻体とした。80 L の培地から乾燥藻体 7.7 g を得た。

#### *Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/16) の培養

*Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/16) を 10 L の培養瓶を用いて CT 培地中で通気培養

を行った (温度 20 °C; 照度 250  $\mu$  mol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; 通気速度 1.5 L min<sup>-1</sup>)。藻体は連続遠心分離により収集し、凍結乾燥を行い乾燥藻体とした。80 L の培地から乾燥藻体 5.5 g を得た。

#### Oscillapeptin G および A の単離

乾燥した *Oscillatoria agardhii* (NIES-610) 99.1 g から 8 L の CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 1 : 3 : 1 を用いて可溶性成分を抽出した。抽出液を減圧乾固後、抽出物を 5 % 酢酸水溶液 1.5 L に懸濁した。不溶物を遠心分離 (3500 x g, 10 min) で除いた後、Sep Pak ODS カートリッジに吸着させた。カートリッジを 20 % MeOH で洗浄した後、90 % MeOH で溶出した。90 % MeOH 溶出画分を減圧乾固した後、溶出物を 20 % MeOH に溶解し逆相 HPLC (Ultron ODS, 20 x 250 mm; 流速 15 mL/min; 測定波長 239 nm; 溶出液 55 % MeOH、50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) で精製することにより oscillapeptin G (5, tR 7.0 min、240.2 mg、乾燥重量の 0.2 %) および oscillapeptin A (6, tR 6.2 min、15.7 mg、乾燥重量の 0.02 %) をそれぞれ単離した。

#### Oscillapeptin B の単離

乾燥した *Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/14) 7.7 g から MeOH 400 mL を用いて可溶性成分を抽出した。抽出液を減圧乾固後、抽出物を 5 % 酢酸水溶液 400 mL に懸濁した。不溶物を遠心分離 (3500 x g, 10 min) で除いた後、Sep Pak ODS カートリッジに吸着させた。カートリッジを 20 % MeOH で洗浄した後、90 % MeOH で溶出した。90 % MeOH 溶出画分を減圧乾固した後、溶出物を 20 % MeOH に溶解し、逆相 HPLC (Mightysil ODS, 20 x 250 mm; 流速 9 mL/min; 測定波長 239 nm; 溶出液 65 % MeOH、50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) および順相 HPTLC (Silica gel 60 F254, 0.25 mm; 展開溶媒 CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 60 : 40 : 10) で精製することにより oscillapeptin B (7, tR 11.7 min、Rf 0.8、16.6 mg、乾燥重量の 0.2 %) を単離した。

#### Oscillapeptin C の単離

乾燥した *Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/16) 5.5 g から MeOH 400 mL を用いて可溶性成分を抽出した。抽出液を減圧乾固後、抽出物を 5 % 酢酸水溶液 400 mL に懸濁した。不溶物を遠心分離 (3500 x g, 10 min) で除いた後、Sep Pak ODS カートリッジに吸着させた。カートリッジを 20 % MeOH で洗浄した後、90 % MeOH で溶出した。90 % MeOH 溶出画分を減圧乾固した後、溶出物を 20 % MeOH に溶解し、逆相 HPLC (Mightysil ODS, 20 x 250 mm; 流速 9 mL/min; 測定波長 239 nm; 溶出液 65 % MeOH、50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) および順相 HPTLC (Silica gel 60 F254, 0.25 mm; 展開溶媒 CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 60 : 40 : 10) で精製することにより oscillapeptin C (8, tR 11.7 min、Rf 0.8、16.6 mg、乾燥重量の 0.2 %) を単離した。



peptin C (8, tR 8.8 min, Rf 0.8, 15.3 mg, 乾燥重量の 0.3 %) を単離した。

#### Oscillapeptin G (5)

無色固体

$[\alpha]_{D^{25}}$	-86° (c 0.94, MeOH)
UV (MeOH)	$\lambda$ max 279 nm (log $\epsilon$ 3.5)
FABMS (pos., glycerol)	$m/z$ 1134 (M+Na) <sup>+</sup>
FABMS (neg., glycerol)	$m/z$ 1110 (M-H) <sup>-</sup>
HRFABMS (pos., glycerol)	found: $m/z$ 1134.5332 (M+Na) <sup>+</sup> calcd for C <sub>53</sub> H <sub>77</sub> O <sub>17</sub> N <sub>9</sub> Na: 1134.5335, $\Delta$ +0.3 mmu
<sup>1</sup> H- and <sup>13</sup> C-NMR	Table 3-1.

#### Oscillapeptin A (6)

無色固体

$[\alpha]_{D^{25}}$	-100° (c 0.05, MeOH)
UV (MeOH)	$\lambda$ max 278 nm (log $\epsilon$ 3.5)
FABMS (pos., glycerol)	$m/z$ 1166 (M+H) <sup>+</sup> , 1148 (M-H <sub>2</sub> O+H) <sup>+</sup> , 1130 (M-2H <sub>2</sub> O+H) <sup>+</sup>
HRFABMS (pos., glycerol)	found: $m/z$ 1166.5737 (M+H) <sup>+</sup> calcd for C <sub>56</sub> H <sub>80</sub> O <sub>18</sub> N <sub>9</sub> : 1166.5621, $\Delta$ +11.6 mmu
<sup>1</sup> H- and <sup>13</sup> C-NMR	Table 3-2.

#### Oscillapeptin B (7)

無色固体

$[\alpha]_{D^{25}}$	-110° (c 0.20, MeOH)
UV (MeOH)	$\lambda$ max 278 nm (log $\epsilon$ 3.2)
FABMS (pos., glycerol)	$m/z$ 995 (M+H) <sup>+</sup>
HRFABMS (pos., glycerol)	found: $m/z$ 995.5425 (M+H) <sup>+</sup> calcd for C <sub>50</sub> H <sub>75</sub> O <sub>13</sub> N <sub>8</sub> : 995.5453, $\Delta$ -2.8 mmu

#### <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR

Table 3-3.

#### Oscillapeptin C (8)

無色固体

$[\alpha]_{D^{25}}$	-85° (c 0.20, MeOH)
UV (MeOH)	$\lambda$ max 279 nm (log $\epsilon$ 3.4)
FABMS (pos., glycerol)	$m/z$ 983 (M+H) <sup>+</sup>
HRFABMS (pos., glycerol)	found: $m/z$ 983.4587 (M+H) <sup>+</sup> calcd for C <sub>47</sub> H <sub>67</sub> O <sub>13</sub> N <sub>8</sub> S: 983.4549, $\Delta$ +3.8 mmu
<sup>1</sup> H- and <sup>13</sup> C-NMR	Table 3-4.

#### 第 5 章の実験の部

#### Oscillatoria agardhii (NIES-610 = CCAP 1459/22 = NIVA CYA 18) の培養

*Oscillatoria agardhii* (NIES-610 = CCAP 1459/22 = NIVA CYA 18) を 10 L の培養瓶を用いて CT 培地中で通気培養を行った (温度 20 °C ; 照度 250  $\mu$  mol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ; 通気速度 1.5 L min<sup>-1</sup>)。藻体は連続遠心分離により収集し、凍結乾燥を行い乾燥藻体とした。1120 L の培地から乾燥藻体 99.1 g を得た。

#### Oscillatoria agardhii (CCAP 1459/11A) の培養

*Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/14) を 10 L の培養瓶を用いて CT 培地中で通気培養を行った (温度 20 °C ; 照度 250  $\mu$  mol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ; 通気速度 1.5 L min<sup>-1</sup>)。藻体は連続遠心分離により収集し、凍結乾燥を行い乾燥藻体とした。80 L の培地から乾燥藻体 9.0 g を得た。

#### Oscillatoria agardhii (CCAP 1459/14) の培養

*Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/14) を 10 L の培養瓶を用いて CT 培地中で通気培養を行った (温度 20 °C ; 照度 250  $\mu$  mol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ; 通気速度 1.5 L min<sup>-1</sup>)。藻体は連続遠心分離により収集し、凍結乾燥を行い乾燥藻体とした。80 L の培地から乾燥藻体 7.7 g を得た。

#### Oscillatoria agardhii (NIES-595) の培養



*Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/14) を 10 L の培養瓶を用いて CT 培地中で通気培養を行った (温度 20 °C ; 照度 250  $\mu$  mol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ; 通気速度 1.5 L min<sup>-1</sup>)。藻体は連続遠心分離により収集し、凍結乾燥を行い乾燥藻体とした。80 L の培地から乾燥藻体 7.0 g を得た。

#### Oscillamide A および Y の単離

乾燥した *Oscillatoria agardhii* (NIES-610) 99.1 g から 8 L の CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 1 : 3 : 1 を用いて可溶性成分を抽出した。抽出液を減圧乾固後、抽出物を 5 % 酢酸水溶液 1.5 L に懸濁した。不溶物を遠心分離 (3500 x g, 10 min) で除いた後、Sep Pak ODS カートリッジに吸着させた。カートリッジを 20 % MeOH で洗浄した後、90 % MeOH で溶出した。90 % MeOH 溶出画分を減圧乾固した後、溶出物を 20 % MeOH に溶解し逆相 HPLC (Ultron ODS, 20 x 250 mm ; 流速 15 mL/min ; 測定波長 239 nm ; 溶出液 55 % MeOH、50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) で精製することにより oscillamide Y (9, tR 15.1 min, 51.1 mg、乾燥重量の 0.05 %) および oscillamide A (10, tR 7.9 min, 25.2 mg、乾燥重量の 0.03 %) をそれぞれ単離した。

#### Oscillamide B の単離

乾燥した *Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/11A) 9.0 g から MeOH 400 mL を用いて可溶性成分を抽出した。抽出液を減圧乾固後、抽出物を 5 % 酢酸水溶液 400 mL に懸濁した。不溶物を遠心分離 (3500 x g, 10 min) で除いた後、Sep Pak ODS カートリッジに吸着させた。カートリッジを 20 % MeOH で洗浄した後、90 % MeOH で溶出した。90 % MeOH 溶出画分を減圧乾固した後、溶出物を 20 % MeOH に溶解し、逆相 HPLC (Mightysil ODS, 20 x 250 mm ; 流速 9 mL/min ; 測定波長 239 nm ; 溶出液 65 % MeOH、50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) および順相 HPTLC (Silica gel 60 F254, 0.25 mm; 展開溶媒 CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 60 : 40 : 10) で精製することにより oscillamide B (11, tR 9.3 min, Rf 0.7, 21.0 mg、乾燥重量の 0.2 %) を単離した。

#### Oscillamide C の単離

乾燥した *Oscillatoria agardhii* (CCAP 1459/14) 7.7 g から MeOH 400 mL を用いて可溶性成分を抽出した。抽出液を減圧乾固後、抽出物を 5 % 酢酸水溶液 400 mL に懸濁した。不溶物を遠心分離 (3500 x g, 10 min) で除いた後、Sep Pak ODS カートリッジに吸着させた。カートリッジを 20 % MeOH で洗浄した後、90 % MeOH で溶出した。90 % MeOH 溶出画分を減圧乾固した後、溶出物を 20 % MeOH に溶解し、逆相 HPLC (Mightysil ODS, 20 x 250 mm ; 流速 9 mL/min ; 測定波長 239 nm ; 溶出液 65 % MeOH、50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) および順相 HPTLC (Silica gel 60 F254,

0.25 mm; 展開溶媒 CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 60 : 40 : 10) で精製することにより oscillamide C (12, tR 8.3 min, Rf 0.8, 7.7 mg、乾燥重量の 0.1 %) を単離した。

#### Oscillamide H の単離

乾燥した *Oscillatoria agardhii* (NIES-595) 7.0 g から MeOH 400 mL を用いて可溶性成分を抽出した。抽出液を減圧乾固後、抽出物を 5 % 酢酸水溶液 400 mL に懸濁した。不溶物を遠心分離 (3500 x g, 10 min) で除いた後、Sep Pak ODS カートリッジに吸着させた。カートリッジを 20 % MeOH で洗浄した後、90 % MeOH で溶出した。90 % MeOH 溶出画分を減圧乾固した後、溶出物を 20 % MeOH に溶解し逆相 HPLC (Ultron ODS, 8 x 250 mm ; 流速 3 mL/min ; 測定波長 239 nm ; 溶出液 55 % MeOH、50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) および順相 HPTLC (Silica gel 60 F254, 0.25 mm; 展開溶媒 CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 60 : 40 : 10) で精製することにより oscillamide H (13, tR 29.0 min, Rf 0.8, 7.5 mg、乾燥重量の 0.1 %) を単離した。

#### Oscillamide Y (9)

無色固体

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>29</sup> -76 ° (c 0.92, MeOH)

UV (H<sub>2</sub>O)  $\lambda$  max 275 nm (log  $\epsilon$  3.1)

FABMS (pos., glycerol)  $m/z$  858 (M+H)<sup>+</sup>

HRFABMS (pos., glycerol) found:  $m/z$  858.4396 (M+H)<sup>+</sup>  
calcd for C<sub>45</sub>H<sub>60</sub>O<sub>10</sub>N<sub>7</sub>: 858.4402,  $\Delta$  +0.6 mmu

<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR Table 5-1.

#### Oscillamide A (10)

無色固体

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>29</sup> -60 ° (c 0.08, MeOH)

UV (MeOH)  $\lambda$  max 279 nm (log  $\epsilon$  3.2)

FABMS (pos., glycerol)  $m/z$  851 (M+H)<sup>+</sup>

HRFABMS (pos., glycerol) found:  $m/z$  851.4818 (M+H)<sup>+</sup>  
calcd for C<sub>42</sub>H<sub>63</sub>O<sub>9</sub>N<sub>10</sub>: 851.4779,  $\Delta$  +3.9 mmu

<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR Table 5-2.



#### Oscillamide B (11)

無色固体

$[\alpha]_{\text{D}}^{30}$	-83 ° (c 0.20, MeOH)
UV (MeOH)	$\lambda$ max 279 nm (log $\epsilon$ 3.5)
FABMS (pos., glycerol)	$m/z$ 869 (M+H) <sup>+</sup>
HRFABMS (pos., glycerol)	found: $m/z$ 869.4324 (M+H) <sup>+</sup> calcd for C <sub>41</sub> H <sub>61</sub> O <sub>9</sub> N <sub>10</sub> S: 869.4344, $\Delta$ -2.0 mmu
<sup>1</sup> H- and <sup>13</sup> C-NMR	Table 5-3.

#### Oscillamide C (12)

無色固体

$[\alpha]_{\text{D}}^{30}$	-111 ° (c 0.15, MeOH)
UV (MeOH)	$\lambda$ max 279 nm (log $\epsilon$ 3.5)
FABMS (pos., glycerol)	$m/z$ 957 (M+H) <sup>+</sup>
HRFABMS (pos., glycerol)	found: $m/z$ 957.5198 (M+H) <sup>+</sup> calcd for C <sub>49</sub> H <sub>69</sub> O <sub>10</sub> N <sub>10</sub> : 957.5198, $\Delta$ +0.0 mmu
<sup>1</sup> H- and <sup>13</sup> C-NMR	Table 5-4.

#### Oscillamide H (13)

無色固体

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$	25 ° (c 0.2, MeOH)
UV (MeOH)	$\lambda$ max 279 nm (log $\epsilon$ 3.5)
FABMS (pos., glycerol)	$m/z$ 930 (M+H) <sup>+</sup>
HRFABMS (pos., glycerol)	found: $m/z$ 930.4891 (M+H) <sup>+</sup> calcd for C <sub>49</sub> H <sub>68</sub> O <sub>11</sub> N <sub>7</sub> : 930.4976, $\Delta$ -8.5 mmu
<sup>1</sup> H- and <sup>13</sup> C-NMR	Table 5-5.

第 6 章の実験の部

#### Oscillatoria agardhii (NIES 610 = CCAP 1459/22 = NIVA CYA 18) の培養

*Oscillatoria agardhii* (NIES-610 = CCAP 1459/22 = NIVA CYA 18) を 10 L の培養瓶を用いて CT 培地中で通気培養を行った (温度 20 °C ; 照度 250  $\mu$  mol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ; 通気速度 1.5 L min<sup>-1</sup>)。藻体は連続遠心分離により収集し、凍結乾燥を行い乾燥藻体とした。1120 L の培地から乾燥藻体 99.1 g を得た。

#### Oscillagin A および B の単離

乾燥した *Oscillatoria agardhii* (NIES-610) 99.1 g から 8 L の CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 1 : 3 : 1 を用いて可溶性成分を抽出した。抽出液を減圧乾固後、抽出物を 5 % 酢酸水溶液 1.5 L に懸濁した。不溶物を遠心分離 (3500 x g, 10 min) で除いた後、Sep Pak ODS カートリッジに吸着させた。カートリッジを 20 % MeOH で洗浄した後、90 % MeOH で溶出した。90 % MeOH 溶出画分を減圧乾固した後、溶出物を 20 % MeOH に溶解し逆相 HPLC (Ultron ODS, 20 x 250 mm ; 流速 15 mL/min ; 測定波長 239 nm ; 溶出液 55 % MeOH, 50 mM リン酸緩衝液 pH 3.0) で精製することにより oscillagin A (14, tR 8.6 min, 37.5 mg, 乾燥重量の 0.04 %) および oscillagin B (15, tR 10.7 min, 37.0 mg, 乾燥重量の 0.04 %) をそれぞれ単離した。

#### Oscillagin A (14)

無色固体

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$	-80 ° (c 0.5, MeOH)
UV (MeOH)	$\lambda$ max 279 nm (log $\epsilon$ 3.2)
FABMS (pos., glycerol)	$m/z$ 615 (M+H) <sup>+</sup> , 617 (M+H+2) <sup>+</sup>
HRFABMS (pos., glycerol)	found: $m/z$ 615.3126 (M+H) <sup>+</sup> calcd for C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub> N <sub>4</sub> <sup>35</sup> Cl: 615.3160, $\Delta$ -3.4 mmu found: $m/z$ 617.3122 (M+H+2) <sup>+</sup> calcd for C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub> N <sub>4</sub> <sup>37</sup> Cl: 617.3131, $\Delta$ -0.9 mmu
<sup>1</sup> H- and <sup>13</sup> C-NMR	Table 6-1.

#### Oscillagin B (15)

無色固体

$[\alpha]_{\text{D}}^{29}$	-100 ° (c 0.5, MeOH)
----------------------------	----------------------



UV (MeOH)

$\lambda$  max 279 nm (log  $\epsilon$  3.2)

FABMS (pos., glycerol)

$m/z$  581 (M+H)<sup>+</sup>

HRFABMS (pos., glycerol)

found:  $m/z$  581.3586 (M+H)<sup>+</sup>

calcd for C<sub>29</sub>H<sub>49</sub>O<sub>8</sub>N<sub>4</sub>: 581.3550,  $\Delta$  +3.6 mmu

<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR

Table 6-1.

## 参 考 文 献

- 1) Cannell, P. J. R. *Pestic. Sci.* (1993) **39**, 147-153.
- 2) Patterson, L. M. G.; Larsen, L. K.; Moore, R. E. *J. Appl. Phycol.* (1994) **6**, 151-157.
- 3) Mynderse, J. S.; Moore, R. E.; Kashiwagi, M.; Norton, T. R. *Nature* (1977) **196**, 538-540.
- 4) Mynderse, J. S.; Moore, R. E. *J. Org. Chem.* (1978) **43**, 2301-2303.
- 5) Moore, R. E.; Blackmann, A. J.; Cheuk, C. E.; Mynderse, J. S.; Matsumoto, G. K.; Clardy, J.; Woodard, R. W.; Craig, J. C. *J. Org. Chem.* (1984) **49**, 2484-2489.
- 6) Carmeri, S.; Moore, R. E.; Patterson, G. M. L. *J. Nat. Prod.* (1990) **53**, 1533-1542.
- 7) Ishibashi, M.; Moore, R. E.; Patterson, G. M. L.; Xu, C.; Clardy, J. *J. Org. Chem.* (1986) **51**, 5300-5306.
- 8) Matsunaga, S.; Fusetani, N.; Hashimoto, K.; Koseki, K.; Noma, M. *J. Am. Chem. Soc.* (1986) **108**, 847-849.
- 9) Cardellina II, J. H.; Marner F. -J.; Moore, R. E. *Science* (1979) **204**, 193-195.
- 10) Takashima, M.; Sakai, H. *Bull. Agr. Chem. Soc. Jpn.* (1960) **24**, 647-651.
- 11) Carmichael, W. W. *Scientific American* (1994) 78-86.
- 12) Botes, D. P.; Tuiman, A. A.; Wessels, P. L.; Viljoen, C. C.; Kruger, H.; Williams, D. H.; Santikarn, S.; Smith, R. J.; Hammond, S. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1* (1984) 2311-2318.
- 13) Kaya, K. *J. Environ. Chem.* (1992) **2**, 457-477.
- 14) Devlin, J. P.; Edwards, O. E.; Gorham, P. R.; Hunter, N. R.; Pike, R. K.; Stavic, B. *Can. J. Chem.* (1977) **55**, 1367-1371.
- 15) Matsunaga, S.; Moore, R. E.; Niemeczura, W. P.; Carmichael, W. W. *J. Am. Chem. Soc.* (1989) **111**, 8021-8023.
- 16) Okino, T.; Matsuda, H.; Murakami, M.; Yamaguchi, K. *Tetrahedron Lett.* (1993) **34**, 501-504.
- 17) Moore, R. E. *J. Indust. Microbiol.* (1996) **16**, 134-143.
- 18) Meriluoto, J. A. O.; Sandstrom, A.; Eriksson, J. E.; Remaud, G.; Graig, A. G.; Chattopadhyaya, J. *Toxicon* (1989) **27**, 1021-1034.
- 19) Furihata, K.; Yun, B. S.; Hidaka, T.; Seto, H. *35th Symp. Chem. Nat. Prod. (Kyoto) Sympo. Paper* (1993) pp. 226-233.



- 20) Shiraishi, F.; Sano, T.; Kaya, K. *J. Environ. Chem.* (1996) in press.
- 21) Sano, T.; Kaya, K. *Tetrahedron Lett.* (1995) **36**, 8603-8606.
- 22) Kusumi, T.; Ooi, T.; Watanabe, M. M.; Takahashi, H.; Kakisawa, H. *Tetrahedron Lett.* (1987) **28**, 4695-4698.
- 23) Krishnamurthy, T.; Szafraniec, L.; Hunt, D. F.; Shabanowitz, J.; Yates III, J. R.; Hauer, C. R.; Carmichael, W. W.; Skulberg, O.; Codd, G. A.; Missler, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989) **86**, 770-774.
- 24) Harada, K.; Ogawa, K.; Kimura, Y.; Murata, H.; Suzuki, M.; Thorn, P. M.; Evans, W. R.; Carmicheal, W. W. *Chem. Res. Toxicol.* (1991) **4**, 535-540.
- 25) Namikoshi, M.; Sivonen, K.; Evans, W. R.; Carmichael, W. W.; Rouhiainen, L.; Luukkainen, R.; Rinehart, K. L. *Chem. Res. Toxicol.* (1992) **5**, 661-666.
- 26) Namikoshi, M.; Rinehart, K. L.; Sakai, R.; Stotts, R. R.; Dahlem, A. M.; Beasley, V. R.; Carmicheal, W. W.; Evans, W. R. *J. Org. Chem.* (1992) **57**, 866-872.
- 27) Namikoshi, M.; Sun, F.; Choi, B. W.; Rinehart, K. L.; Carmicheal, W. W.; Evans, W. R.; Beasley, R. V. *J. Org. Chem.* (1995) **60**, 3671-3679.
- 28) Rinehart, K. L.; Namikoshi, M.; Choi, B. W. *J. Appl. Phycol.* (1994) **6**, 159-176.
- 29) Nagata, S.; Soutome, H.; Tsutsumi, T.; Hasegawa, A.; Sekijima, M.; Sugamata, M.; Harada, K.; Suganuma, M.; Ueno, Y. *Natural Toxins* (1995) **3**, 78-86.
- 30) Sano, T.; Nohara, K.; Shiraishi, F.; Kaya, K. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* (1992) **49**, 163-170.
- 31) Pauling P.; Petcher, T. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1973) 1342-1345.
- 32) Shioiri, T.; Ninomiya, K.; Yamada, S. *J. Am. Chem. Soc.* (1972) **94**, 6203-6205.
- 33) Radhakrishna, A. S.; Parham, M. E.; Riggs, R. M.; Loudon, G. M. *J. Org. Chem.* (1979) **44**, 1746-1747.
- 34) Sano, T.; Kaya, K. *Tetrahedron Lett.* (1996) **37**, 6873-6876.
- 35) Carle, S. J.; Christophersen, C. *J. Org. Chem.* (1980) **45**, 1586-1589.
- 36) Ishida, K.; Matsuda, H.; Murakami, M.; Yamaguchi, K. *Tetrahedron* (1996) **52**, 9025-9030.
- 37) Sano, T.; Kaya, K. *J. Nat. Prod.* (1996) **59**, 90-92.
- 38) Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Herald, C. L.; Dufresne, C.; Cerny, R. L.; Herald, D. L.; Schmidt, J. M.; Kizu, H. *J. Am. Chem. Soc.* (1989) **111**, 5015-5017.
- 39) Okino, T.; Murakami, M.; Haraguchi, R.; Munekata, H.; Matsuda, H.; Yamaguchi, K.

- Tetrahedron Lett.* (1993) **34**, 8131-8134.
- 40) Ishida, K.; Murakami, M.; Matsuda, H.; Yamaguchi, Y. *Tetrahedron Lett.* (1995) **36**, 3535-3538.
- 41) Harada, K.; Mayumi, T.; Shimada, T.; Suzuki, M.; Kondo, F.; Watanabe, F. M. *Tetrahedron Lett.* (1993) **34**, 6091-6094.
- 42) Tsukamoto, S.; Painuly, P.; Young, K. A.; Yang, X.; Shimizu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* (1993) **115**, 11046-11047.
- 43) Martin, C.; Oberer, L.; Ino, T.; Konig, W. A.; Busch, M.; Weckesser, J. *J. Antibiotics* (1993) **46**, 1550-1556.
- 44) Lee, A. Y.; Smitka, T. A.; Bonjouklian, R.; Clardy, J. *Chem. Biol.* (1994) **1**, 113-117.
- 45) Bonjouklian, R.; Smitka, T. A.; Hunt, A. H.; Occolowitz, J. L.; Perun Jr., T. J.; Doolin, L.; Stevenson, S.; Knauss, L.; Wijayarathne, R.; Szewczyk, S.; Patterson, G. M. L. *Tetrahedron* (1996) **52**, 395-404.
- 46) Shin, H. J.; Murakami, M.; Matsuda, H.; Ishida, K.; Yamaguchi, K. *Tetrahedron Lett.* (1995) **36**, 5235-5238.
- 47) Sano, T.; Kaya, K. *Tetrahedron Lett.* (1995) **36**, 5933-5936.
- 48) Harada, K.; Fujii, K.; Shimada, T.; Suzuki, M.; Sano, H.; Adachi, K.; Carmichael, W. W. *Tetrahedron Lett.* (1995) **36**, 1511-1514.
- 49) Kobayashi, J.; Sato, M.; Murayama, T.; Ishibashi, M.; Wälchli, M. R.; Kanai, M.; Shoji, J.; Ohizumi, Y. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1991) 1050-1053.
- 50) Kobayashi, J.; Sato, M.; Murayama, T.; Ishibashi, M.; Shigemori, H.; Nakamura, T.; Ohizumi, Y. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1991) 2609-2611.
- 51) Matsuura, F.; Hamada, Y.; Shioiri, T. *Tetrahedron* (1994) **50**, 11303-11314.
- 52) Bunnage, M. E.; Burke, A. J.; Davies, S. G.; Goodwin, C. J. *Tetrahedron* (1994) **5**, 203-206.
- 53) Sano, T.; Kaya, K. *Phytochem.* (1996) accepted.
- 54) Moore, R. E.; Bornemann, V.; Niemczura, W. P.; Gregson, J. M.; Chen, J.; Norton, T. R.; Patterson, G. M. L.; Helms, G. L. *J. Am. Chem. Soc.* (1989) **111**, 6128-6123.



謝 辞

終わりにのぞみ、本研究を行うに当たり終始御懇篤なるご指導、御鞭撻を賜りました国立環境研究所彼谷邦光室長に心より感謝の意を表します。

また本研究に際し終始有益なる御助言を賜りました徳島大学薬学部楠見武徳教授に心より感謝いたします。

藍藻類の培養にご協力を頂きました国立環境研究所渡辺信室長ならびに国立環境研究所微生物系統保存施設の皆様に深謝致します。藍藻の培養および生理活性物質の精製にご協力頂きました立花孝之氏に厚く御礼申し上げます。*Oscillatoria agardhii* の株を譲渡していただいた英国 CCAP John G. Day 博士に感謝いたします。

D- および L-homotyrosine の標品を分与していただきました英国 University of Southampton Mark Bradley 博士に感謝いたします。

機器分析の測定を行っていただきました国立環境研究所伊藤裕康博士、鈴木千枝子氏、芹澤滋子氏、林順子氏、坂田明子氏に厚く御礼申し上げます。

細胞毒性を測定していただくとともに、終始暖かい御助言、激励を賜りました国立環境研究所白石不二雄主任研究員に深く感謝致します。



